



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**INTERAKCE ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK S ORGANICKÝMI
POLOVODIČI**

INTERACTION OF ANIMAL CELLS WITH ORGANIC SEMICONDUCTORS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Schildová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Víteček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1406/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Veronika Schildová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Víteček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Interakce živočišných buněk s organickými polovodiči

Zadání bakalářské práce:

Náplní tohoto tématu bude testování biokompatibility organických polovodičů vůči buněčným kulturám. Studentka se v teoretické části seznámí s organickými polovodiči (polymery a nízkomolekulární látky) a přístupy testování biokompatibility a specifiky těchto testů na úrovni buněčných kultur. Dále se bude zabývat principy změn biokompatibility materiálů. V praktické části budou prováděny testy biokompatibility organických polovodičů. K tomuto budou využity buněčné kultury (3T3 fibroblasty, apod.) Organické polovodiče budou testovány co do schopnosti umožnit adhezi buněk. Dále bude sledována toxicita materiálů pomocí změn viability, proliferace a případně dalších základních fyziologických projevů buněk.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Veronika Schildová
student(ka)

Mgr. Jan Víteček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem biokompatibility organických polovodičů. V teoretické části byly popsány organické polovodiče, jejich vlastnosti, výhody a příklady vybraných zařízení na bázi organických polovodičů. Dále byla definována biokompatibilita a možnosti jejího stanovení, mezi které patří testy cytotoxicity, test stability materiálů, test adheze buněk aj. Poslední část byla zaměřena na buněčné kultury, optimální podmínky kultivace a složení média pro *in vitro* testování biokompatibility. V praktické části jsou prezentovány výsledky stanovení biokompatibility sledovaných materiálů. Pro testování byly použity 3T3 myší fibroblasty.

ABSTRACT

This bachelor's thesis was focused on study of biocompatibility of organic semiconductors. In introduction, organic semiconductors and their properties, benefits and features of selected representatives were described. In the following part biocompatibility definition and approaches for its assays including tests of cytotoxicity, material stability were presented. The last part was focused on overview of cell cultures, appropriate cultivation conditions and compounds of media for *in vitro* testing of biocompatibility. Experimental part showed the result of biocompatibility testing of materials. For this purpose murine 3T3 fibroblasts were used.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organické polovodiče, PEDOT, flavinové materiály, biokompatibilita, MTT test, ATP test, propidium jodid, fluorescein diacetát, buněčná kultura, 3T3 myší fibroblasty

KEYWORDS

Organic semiconductors, PEDOT, flavin's materials, biocompatibility, MTT assay, ATP assay, propidium iodide, fluorescein diacetate, cell cultures, murine 3T3 fibroblasts

SCHILDOVÁ, Veronika. *Interakce živočišných buněk s organickými polovodiči* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-03-22]. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Mgr. Jan Víteček, Ph.D. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116310>.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu Mgr. Janu Vítečkovi, Ph.D. za cenné a profesionální rady, přátelský přístup a pomoc při měření a psaní bakalářské práce a také možnost být součástí jeho týmu. Mé poděkování patří samozřejmě i Mgr. Evě Šafaříkové a všem pracovníkům na Oddělení biofyziky imunitního systému, BFÚ AVČR, v.v.i., za přátelský přístup, rady a příjemné pracovní prostředí. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Chemické fakulty VUT v Brně za poskytnutí materiálů pro testování a také mé rodině za pomoc a podporu.

OBSAH

ÚVOD	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1 Organické polovodiče	8
1.1 Charakteristika polovodičů	8
1.2 Princip vedení elektrického proudu v organických látkách	9
1.3 Organické polovodiče	10
1.3.1 Amorfnní polovodiče	11
1.3.2 Krystalické polovodiče	11
1.3.3 Polovodivé polymery	12
1.4 Historie	12
1.5 Využití organických polovodičů	13
2 Biokompatibilita	15
2.1 Historie a současnost	15
2.2 Smáčivost povrchu	15
2.3 Extrakce v roztoku	16
2.4 Cytotoxicita	16
2.4.1 Testy s tetrazoliovými solemi	16
2.4.2 ATP test	17
2.4.3 Fluorimetrický test s propidium jodidem	18
2.4.4 Fluorimetrický test s fluorescein diacetátem	18
3 Buněčné kultury	19
3.1 Kultivace	19
3.2 Médium	20
3.3 Růstová křivka	20
CÍL PRÁCE	22
PRAKTICKÁ ČÁST	23
4 Materiál	23
4.1 Organické materiály	23
4.2 Buněčná linie	25
4.3 Použité chemikálie a jejich složení	25
5 Přístroje a zařízení	27

6	Postupy použitých metod ke stanovení biokompatibility materiálu	28
6.1	Úhel smáčení.....	28
6.2	Extrakce materiálu v PBS pufru.....	28
6.1	Kultivace buněčné kultury	29
6.2	Schopnost materiálu umožnit adhezi buněk.....	29
6.3	MTT test.....	29
6.4	Test nepřímé toxicity	30
6.5	ATP test	31
6.6	Detekce viability pomocí fluorescenčního mikroskopu.....	31
7	Výsledky testů	32
7.1	Úhel smáčení.....	32
7.2	Extrakce materiálu v PBS pufru.....	33
7.3	Adheze buněk.....	34
7.3.1	1. sada testovaných materiálů – Flavinové analogy	34
7.3.2	2. sada testovaných materiálů – PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie	36
7.4	Testy cytotoxicity.....	37
7.4.1	1. sada testovaných materiálů – Flavinové analogy	37
7.4.2	2. sada testovaných materiálů – PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie	38
7.5	Detekce viability pomocí fluorescenčního mikroskopu.....	38
8	Shrnutí a diskuze	42
9	Závěr.....	45
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ:.....	46
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	56

ÚVOD

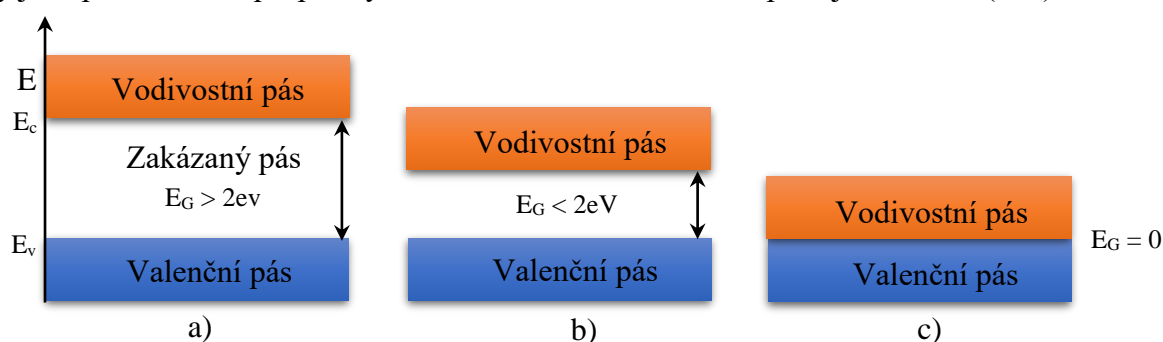
Biosenzory jsou analytická zařízení, která převádějí biologickou odpověď na elektrický signál [1]. Snaha k vytvoření levnějších, citlivějších a přesnějších biosenzorů vede výzkumné týmy vymýšlet nové výrobní postupy a inovativní materiály, ze kterých by mohly být biosenzory vyrobeny. V tomto ohledu mají organické polovodiče velký potenciál, jelikož mohou nahradit stávající materiály. Cílem této bakalářské práce bylo stanovit, zda připravené organické materiály jsou biokompatibilní a mohou sloužit, kromě jiného využití, i pro výrobu biosenzorů, které by mohly mít potencionální využití v medicíně. Biokompatibilita byla stanovována u flavinových materiálů, materiálu poly(3,4-ethylendioxythiofen) s uhlíkovými nanotrubičkami (PEDOT CNT), uhlíkové pastě a polyethylennaftalátovou (PEN) folii. Byl hodnocen charakter povrchu, stabilita v roztoku nebo cytotoxicita materiálů pomocí *in vitro* testů s buněčnou kulturou 3T3 myší fibroblasty.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Organické polovodiče

1.1 Charakteristika polovodičů

Zda je látka vodič, polovodič nebo izolant se u anorganických látek určuje na základě velikosti zakázaného pásu, který se nachází mezi valenčním pásem s nejvyšší energií E_v a vodivostním pásem s nejnižší energií E_c . Elektrony ve valenčním páse se podílejí na chemické vazbě, naopak elektrony ve vodivostním páse jsou uvolněny z vazeb a způsobují elektrickou vodivost látky. Rozdíl energií valenčního a vodivostního pásu se nazývá energie zakázaného pásu E_G (Obr. 1). Pokud je tato energie několik elektronvoltů, látka se chová jako izolant, pokud je od ≈ 0 až 2 eV látky jsou polovodiče a při překryvu vodivostního a valenčního pásu jde o vodič (kov) [2, 3].



Obr. 1: Pásové schéma pro a) izolant, b) polovodič a c) vodič, E_G je energie zakázaného pásu, E_v je nejvyšší energie valenčního pásu a E_c je nejnižší energie vodivostního pásu. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015

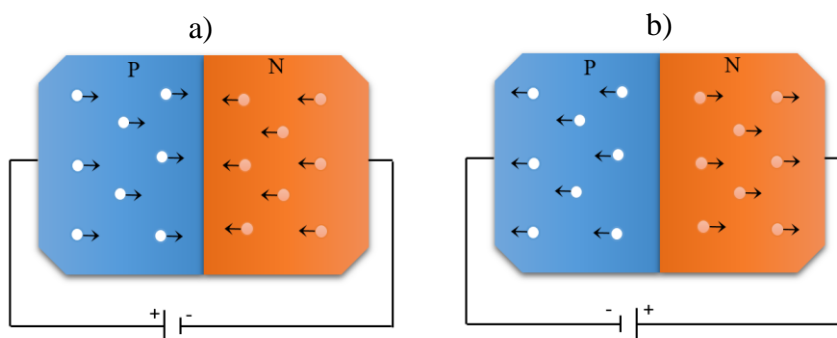
Nejčastější prvky, které se používají k výrobě polovodičů, patří do IV. skupiny v periodické tabulce. Prvky mají jedinečnou elektronovou strukturu, protože mají 4 valenční elektrony. Tyto elektrony vytváří dokonalé kovalentní vazby se čtyřmi sousedními atomy a tvoří tak mřížku. Útvary, které jsou vytvořené pomocí těchto mřížek, se nazývají krystaly [4, 5].

Pokud jsou polovodiče čisté bez příměsí, mají nízkou elektrickou vodivost, neboť nemají volné elektrony. Elektrony se mohou uvolnit pouze tehdy, když získají dostatečnou energii (u germánia asi 0,7 eV a u křemíku asi 1,1 eV). energii dodáme zahřátím nebo dopadajícím zářením. Druhým způsobem vedení proudu u polovodičů je přidání příměsí do krystalové mřížky. To znamená jiný prvek. Nejčastěji se používají arzen, fosfor, antimon (N-typ) nebo bor, hliník, galium (P-typ) [4, 5].

- N-typ (negativní) vzniká přidáním prvků z V. skupiny, které obsahují 5 elektronů ve své valenční vrstvě a jen 4 z nich se uplatní při kovalentní vazbě s ostatními atomy prvků IV. skupiny. Elektrony nevyužité pro tuto vazbu se podílejí na vedení elektrického proudu [4, 5].
- P-typ (pozitivní) vznikne po přidání prvků z III. skupiny, ty mají 3 valenční elektrony a po umístění do krystalové mřížky vznikají „díry“. Elektrony, které ztratily vazebné

partnery, jsou volné a mohou vést elektrický proud tak, že se volný elektron posune do „díry“ a vzniká nová [4, 5].

Po spojení P a N typu polovodiče vzniká na jejich rozhraní PN přechod, kde dochází k difúzi děr z polovodiče typu P do N a elektronů z polovodiče typu N do P. Vytvoří se dynamická rovnováha a na rozhraní obou polovodičů vzniká vnitřní elektrické pole. Po zapojení do elektrického obvodu tak, že P-typ je spojen s anodou a N-typ s katodou, dojde k vzájemné výměně „děr“ z oblasti P a elektronů z oblasti N, které jsou uvedeny do pohybu pomocí elektrického pole zdroje. Tomuto typu zapojení se říká propustný směr, zde elektrický proud proudí. Opačným zapojením proud neprochází a je to nazýváno jako závěrný směr (Obr. 2). S polovodiči se můžeme setkat v diodách, čípech, tranzistorech apod. [4, 5].



Obr. 2: Ukázka spojení P a N typu polovodiče, a) propustný směr, tedy dochází k PN přechodu, proud prochází, b) závěrný směr, proud neprochází. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015

1.2 Princip vedení elektrického proudu v organických látkách

Organické sloučeniny byly obecně považovány za nevodivé látky. Tento fakt byl vyvrácen ve 20. století, kdy byla objevena řada elektricky vodivých organických sloučenin (*kapitola 1.4*). Od objevení vodivosti u organických materiálů se zkoumá mechanismus transportu náboje, který je vysvětlován následovně [2, 6]:

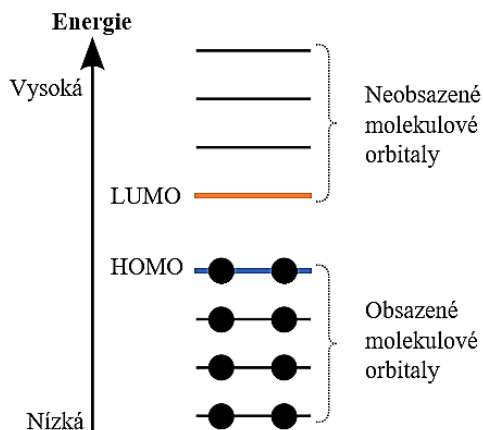
Přítomnost konjugované vazby, to znamená střídání jednoduché (σ vazba) a dvojně vazby (σ a π vazba), ve struktuře organických vodičů je podmínkou pro jejich vodivost. Vazba σ je stabilnější než vazba π . U σ vazeb je největší hustota vazebného elektronového oblaku na spojnici jader vázaných atomů, zatímco u π vazeb je největší hustota vazebného elektronového oblaku symetricky rozložena nad a pod spojnici jader obou vázaných atomů. Díky pravidelnému střídání jednoduché a dvojně vazby dochází k silné delokalizaci π -elektronů, která nastává při překrytí jednotlivých orbitalů. Výsledkem je pak vytvoření jednotlivých energetických hladin s energetickou mezerou (zakázaný pás), podobně jako je tomu u anorganických látek. Energetická mezera se pohybuje většinou mezi 1,5 a 3 eV. Velikost energetické mezery je závislá na stupni konjugace jednotlivých systémů v makromolekule. To umožňuje existenci různých typů modifikace optických vlastností organických materiálů [2, 3, 9, 12].

Z pohledu vodivosti lze organické materiály rozdělit do dvou základních skupin: kompozitní organické vodivé látky a organické látky s vlastní vodivostí [3, 6].

- Kompozitní organické vodivé látky (kompozity) sami o sobě nejsou vodivé. Vodivost se u nich vytvoří díky přidaným příměsím tzv. dopingem. Jedná se o mikroskopické částice anorganických materiálů (např. práškový grafit), které jsou zabudovány do struktury organických látek. Velikost elektrické vodivosti je závislá na druhu, tvaru, velikosti, množství a homogenitě anorganického materiálu, který je přidán. Kompozity, tedy organické látky s příměsí, lze využít při výrobě např. fotocitlivé vrstvy pro xerografii a laserový tisk, piezoelektrické a pyroelektrické detektory či tištěné fotoodpory. Hodí se také např. pro výrobu lehkých plastových kanystrů na benzin, kde vodivý kompozit odvádí elektrostatický náboj, nehrozí tedy vznícení těkavých par [3, 6].
- Vlastní vodivost u organických látek způsobuje jejich struktura, tedy pravidelné střídání jednoduchých a dvojných vazeb v molekulární struktuře. Nezbytná je, kromě konjugace, také přítomnost pohyblivých nosičů náboje, které umožňují pohyb náboje po konjugovaném řetězci. Vědci se zabývají využitím těchto látek a jejich unikátních vlastností v elektronických aplikacích [3, 6].

1.3 Organické polovodiče

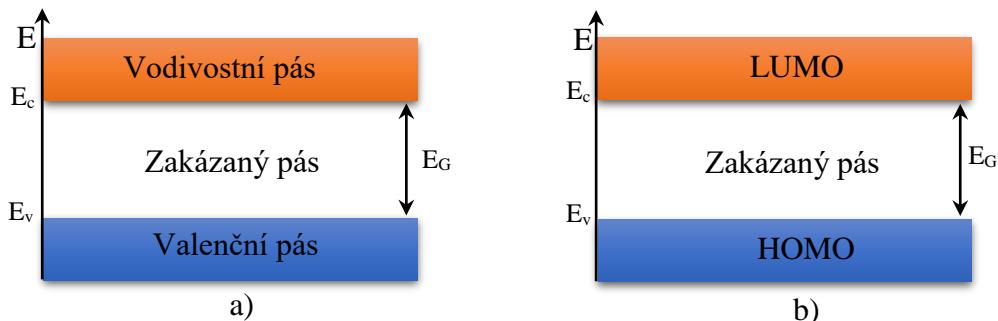
Podobně jako se určuje u anorganických látek, zda jde o izolant, polovodič nebo vodič (*kapitola 1.1*), lze toto určit u organických látek. Energie zakázaného pásu je rozdíl mezi LUMO (nejnižší neobsazený molekulový orbital) a HOMO (nejvyšší obsazený molekulový orbital) vrstvou (*Obr. 3, Obr. 4*), kdy jejich velikost lze zjistit pomocí ultrafialové fotoelektronové spektroskopie.



Obr. 3: Ukázka LUMO a HOMO vrstvy. Černé tečky označují elektrony v molekulovém orbitalu. LUMO vrstva je označení nejnižší vrstvy neobsazených molekulových orbitalů a HOMO vrstva je nejvyšší vrstva obsazených molekulových orbitalů. Obrázek byl vytvořen v programu

PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015

Pozice jednotlivých vrstev orbitalů silně ovlivňuje přítomnost ostatních atomů v látce, proto u organických sloučenin nemají přesně definované uspořádání jako je tomu u anorganických sloučenin [2, 3].



Obr. 4: Pásové schéma a) anorganického polovodiče a b) organického polovodiče, kde E_G je energie zakázaného pásu, E_v je nejvyšší energie valenčního pásu, E_c je nejnižší energie vodivostního pásu. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015

Organický polovodič je materiál, který se skládá převážně z uhlíku, vodíku, dusíku, síry a kyslíku, a zároveň vykazuje vlastnosti typické pro polovodičové materiály, tedy absorpce a emise záření ve viditelném světle a má takový stupeň vodivosti, který je dostatečný pro provoz klasických polovodičových zařízení, např.: světelné diody, solární články nebo tranzistory. Avšak jejich polovodičová povaha není stejná jako u anorganických polovodičů. Vazby v organických polovodičích jsou zprostředkovávány pomocí slabých interakcí, jako jsou van der Waalsovy síly nebo vodíkové můstky. Naopak vazby u anorganických polovodičů jsou tvořené silnými kovalentními nebo iontovými vazbami mezi atomy v krystalové mřížce. Mezimolekulární vzdálenosti jsou velké ve srovnání se vzdálenostmi mezi atomy nebo ionty anorganických materiálů, takže překryv molekulárních orbitalů je slabý a mezimolekulární elektronová výměna malá. Organické polovodiče lze rozdělit na tyto základní skupiny [2, 6, 7]:

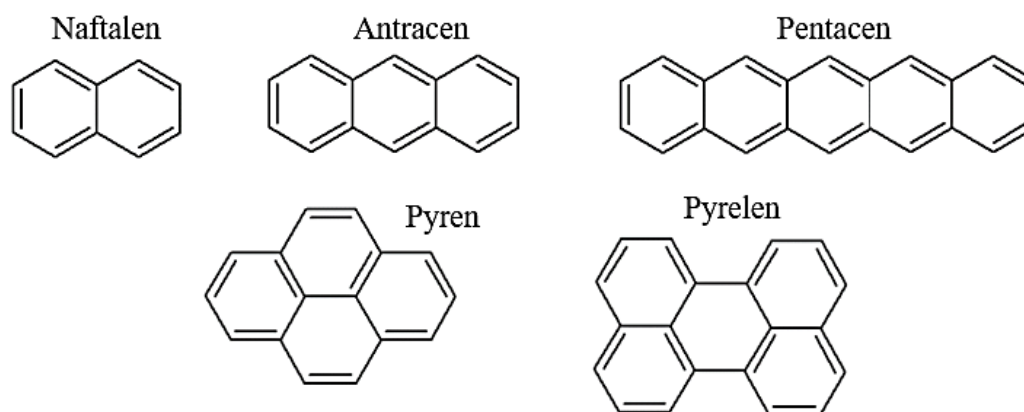
1.3.1 Amorfní polovodiče

Amorfní polovodiče jsou neuspořádané nebo sklovité formy krystalických polovodičových materiálů. Molekuly jsou většinou tvořeny fenylovými kruhy, pěti- nebo šestičlennými heterocykly s navázanými atomy dusíku, síry či kyslíku. Vždy mají zabudovaný systém střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb. Dle jejich struktury a počtu aromatických kruhů se odvíjejí i vlastnosti, jako jsou absorpce a emise záření, jejich funkce v zařízeních apod. Molekuly, které jsou schopné vyžářit velké množství záření, se používají pro organické elektroluminiscenční diody (OLED). Je to typ diody, která je využívána na displejích mobilních telefonů, televizí apod. Molekuly, které jsou schopné pohltit velké množství záření, našly uplatnění v solárních článcích [7, 8].

1.3.2 Krystalické polovodiče

Struktura krystalických polovodičů je pravidelně uspořádána, podobně jako je tomu u anorganických polovodičů. V anorganickém krystalu, jako je křemík nebo germanium, tvoří

základ atomy, zatímco u organických vodičů to je molekula, která je plochá a s velkým počtem aromatických systémů. Patří sem zejména naftalen, antracen, tetracen, pentacen, pyren nebo pyrenen a podobné sloučeniny (*Obr. 5*). Dnešní technologický zájem o polovodičové krystaly se projevuje převážně v oblasti organických tranzistorů řízených elektrickým polem (OFET). Tato zařízení byla vyvinuta pro realizaci levné, velkoplošné a biologicky odbouratelné elektroniky (*kapitola 1.5*) [7, 8].



Obr. 5: Příklady molekul krystalických polovodičů. Obrázek byl vytvořen v programu ChemSketch, verze 11.02, © 2008 a upraven v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

1.3.3 Polovodivé polymery

Polovodivé polymery se skládají z mnoha opakujících se monomerních jednotek. Každý řetězec obsahující až 20 opakujících se jednotek se označuje jako oligomer. Nad 20 jednotek v řetězci jde už o polymer. Páteř polovodičového polymeru je tvořena řetězcem z uhlíkových atomů se střídající se jednoduchou a dvojnou vazbou. Přítomné mohou být i heterocykly či aromatické kruhy. Velká část dnešních polovodičových polymerů obsahuje boční řetězce, které jsou tvořeny atomy uhlíku s jednoduchými vazbami. Díky přítomným řetězcům je polymer rozpustný a tyto řetězce také ovlivňují elektrické interakce, které se dějí v polymeru. Interakce mezi řetězci určují účinnost luminiscence, která je klíčovým prvkem v OLED, generování nosiče náboje v konstrukcích solárních článků a mobilita nosičů náboje v OFET [7, 8].

Rozdíl mezi zmíněnými organickými vodiči je způsob výroby tenkého vodivého filmu na podklad. Molekuly polovodiče s nízkou molekulovou hmotností jsou vyrobeny sublimací z plynné fáze nebo podtlakovou depozicí. Jiný způsob přípravy filmu je vyvoláním vzniku a růstu krystalů. Samotné polymery vznikají chemickou nebo elektrochemickou polymerací, následně se kapalná fáze nanáší potiskem nebo odstřediváním na podklad [9].

1.4 Historie

První zmínka o organických vodičích pochází z 19. století, kdy roku 1840 popsal J. Fritsche oxidaci anilinu, pomocí které získal nejstarší člověkem vytvořený organický polymer zvaný

polyanilin. Jeho elektrické vlastnosti byly publikovány v 60. letech 20. století, ale kvůli složitosti molekuly polyanilinu začali vědci výzkum elektrické vodivosti na jiné molekule, na nejjednodušším polymeru polyacetylen [2, 3, 6, 7].

První studie o vodivosti, fotovodivosti, fotoelektrickém účinku a fluorescenci organických pevných látek byly prováděny na počátku dvacátého století. V roce 1953 A. Bernanose interpretoval elektroluminiscenci na celulóзовém filmu s dopingem akridinové oranž. Hlavní období výzkumu molekulových krystalů se uskutečnilo v letech 1950 až 1980. Avšak bylo zjištěno, že molekulové krystaly, které poji van der Waalsovy síly, jsou křehké a vyžadují určité minimum tloušťky v rozmezí několika mikrometrů. To vede k velmi vysokým hodnotám napětí až 100 V, které je potřebné k vedení elektrického proudu. Z tohoto důvodu se výzkum přesunul na polymery. V roce 1970 došlo k objevu, že vysoká vodivost může být získána dopingem v π -konjugovaných polymerech, tedy v uhlovodících s jednoduchými a dvojnými vazbami. Za tento objev byli oceněni v roce 2000 Nobelovou cenou za chemii Alan G. Macdiarmid, Alan J. Heeger, Hideki Širakawa. Od počátků 21. století je výzkum a vylepšování organických vodičů na vysoké úrovni. Vědecké skupiny neustále nacházejí nové možnosti jejich využití [2, 3, 6, 7].

1.5 Využití organických polovodičů

Výhodou je, že zařízení s organickými polovodiči je lehčí, tenčí, levnější, flexibilnější a ekologičtější v porovnání s těmi, které jsou založeny na anorganických polovodičích. Obrovský potenciál využití se uplatnil například v elektronických zařízeních, především ve fotosenzorech a solárních článcích [8].

V dnešní době je cena na pořízení klasických solárních článků vysoká. To se promítne na několikanásobně dražší elektřinu získané ze solárních článků oproti elektřině z běžných elektráren. Využitím organických materiálů na výrobu solárních článků klesnou několika násobně náklady, což umožní vyrábět elektřinu ve větším rozsahu šetrněji k životnímu prostředí, protože se jedná o zisk elektřiny z přírodních zdrojů nikoliv z např. jaderných nebo uhelných elektráren. Organické solární články jsou zatím předmětem dalšího výzkumu, protože nedosahují takové účinnosti jako ty anorganické. Ale díky svým vlastnostem, např. nízká cena, flexibilita nebo tenkost, jsou velkým zájmem mnoha výzkumných skupin po celém světě [10, 11].

V roce 1987 chemici Ching Wan Tang a Steven Van Slyke, pracující ve společnosti Eastman Kodak, prezentovali první praktickou aplikaci organických polovodičů ve formě organických elektroluminiscenčních diod (OLED), které připravily cestu pro novou generaci zobrazovacích technologií. OLED jsou polovodičové fólie složené z organické sloučeniny s elektroluminiscenčními vlastnostmi, které využívají elektrický proud k vyzařování světla. Tato technologie má široké uplatnění a byla začleněna do displejů pro mobilní telefony, palubní desky automobilů a televizní obrazovky. Velkou výhodou těchto displejů je jejich vysoký kontrast, tenkost, velmi rychlá odezva, široký pozorovací úhel, nízká spotřeba energie,

nízká hmotnost a také plné barvy. Z velké části nahradily dříve používané displeje s tekutými krystaly (LCD displeje) [14, 15].

V květnu roku 2007 poprvé převedla společnost Sony corp. jeden z prvních plně barevných, flexibilních, plastických displejů na bázi organických tranzistorů řízených elektrickým polem (OFET). Tranzistory jsou postupem let zdokonalovány a modifikovány pro jejich snadnou a levnou výrobu a flexibilitu, například tranzistor se zvláštní strukturou OCMFET, který je schopný pracovat při nízkých napětích a je vhodný pro výrobu velkoplošných technik. Jeho využití je diskutováno v biomedicínské oblasti a také se předpokládá, že ho lze použít v kombinaci s pyroelektrickými materiály a stlačitelnými kondenzátory za účelem snímání teploty. Takto získané snímače pracují v rozmezí teplot 18,5–50 °C. Výsledky těchto snímačů jsou reprodukovatelné a přesné [16, 17, 18].

K výrobě OFET je nutná pouze malá vrstva (několik mikrometrů) polovodičových krystalů. U aplikace krystalů polovodiče v OFET je důležitá jejich čistota ale i orientace k elektrodě kvůli transportu náboje v krystalech. OFET získaly velkou pozornost kvůli jejich dobré zpracovatelnosti, nízkoteplotní depozici, nízké ceně a slučitelnosti s technologií velkoplošného tisku. Materiály na bázi křemíku mají nízkou pružnost, proto nejsou často zpracovány na ohebných podkladech [16, 17, 18].

Velký potenciál mají také vodivé polymery. Jedná se o inovativní a zajímavé materiály, které jsou mechanicky odolné, snadno modifikovatelné a rozpustné, což umožňuje jejich lisování do různých tvarů a tloušťek. Z tohoto důvodu jsou v posledních letech velkým cílem výzkumu. Vědci pracují na vylepšování struktur a nalezení optimálních fyzikálních vlastností organických vodičů, které by mohly doplnit a v budoucnu i nahradit současně široce využívané anorganické polovodiče. Zajímavé fyzikálně-chemické vlastnosti by polymerům umožňovaly použití v různých oblastech techniky: elektronika, lékařství nebo environmentální odvětví, např. flexibilní světelné zdroje, široké a tenké displeje, biosenzory, protézy a léky nové generace, které mají elektrostimulované obaly apod. Vzhledem k jejich možným rozsáhlým možnostem využití, byly organické polovodiče nazvány jako „materiály budoucnosti“ [6, 9].

2 Biokompatibilita

Biokompatibilita je souhrn fyzikálně-chemických a biologických vlastností materiálů, které určují, zda jsou materiály slučitelné s biologickým systémem bez škodlivých účinků. Tedy nepůsobí na organismy toxicky, nenarušují jejich metabolismus ani životaschopnost [19,20].

Aby bylo možné správně určit, zda je materiál biokompatibilní, je nutno znát složení, postup výroby, ale také k čemu bude používán a se kterými biologickými povrchy bude v kontaktu. Celkové hodnocení materiálů je prováděno podle pokynů stanovených mezinárodními regulačními orgány, jako jsou ISO 10993, EP, USP, MHLW [21, 22, 23].

2.1 Historie a současnost

Ke stanovení biokompatibility se přistoupilo při výrobě prvních biomateriálů, kdy vznikaly první testy, které se stanovovaly empirickým pozorováním. Na základě shromážděných pozorování je možné dnes předvídat biokompatibilitu některých materiálů, zejména anorganických jako jsou kovy a keramika [23, 24].

V současné době jsou postupy testování biokompatibility materiálů standardizovány řadou organizací, mezi které patří Americká společnost pro testování a materiály (ASTM), Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) a US Pharmacopeia (USP). Tyto normy specifikují požadavky na vzorky, zkušební podmínky, kontroly a interpretaci dat pro testy *in vitro* a *in vivo*. Testy *in vivo* se zvířecími modely se používají pro simulaci lidského fyziologického prostředí, proto tyto testy jsou úplnější, spolehlivější a jsou nezbytné pro bezpečné používání zdravotnických materiálů [23, 24].

Dnes je velmi rozvinuté zkoumání a testování *in vitro*. Jedná se o relativně rychlý, snadný a oproti *in vivo* levný způsob, který minimalizuje testování na zvířatech. Biokompatibilita se může stanovovat *in vitro* různými způsoby, mezi které patří například testy cytotoxicity. V závislosti na délce kontaktu materiálů s biologickým povrchem se dělí na krátkodobé (v řádech hodin) a dlouhodobé (řády dnů). Tyto testy se zabývají interakcí testovaných materiálů s buněčnou kulturou [23, 24].

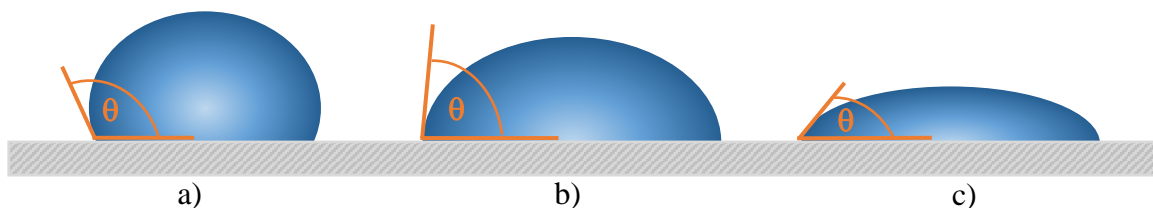
2.2 Smáčivost povrchu

Mezi testy biokompatibility patří test smáčivosti povrchu. Jedná se o vlastnost kapaliny přilnout k povrchu pevné látky. Je závislá na drsnosti povrchu, chemickém složení a druhu kapaliny. Je-li měřicí kapalinou voda, rozeznáváme hydrofobní a hydrofilní charakter povrchu látky [39, 40].

Jak moc kapalina smáčí povrch pevné látky, se zjišťuje pomocí úhlu smáčení neboli kontaktního úhlu θ , který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním (Obr. 6). Úhel smáčení je jedna z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní kapaliny a pevné látky. Vhodný úhel smáčení vodou pro adhezi buněk je mezi 30–110°, jedná se o hydrofilní povrch, kdy v rozmezí 40–65° jde o optimální podmínky pro adhezi buněk. Nevhodné prostředí pro adhezi je vytvořeno povrchem s úhlem smáčení

nad 110° (hydrofobní charakter), pod 30° (vysoce hydrofilní charakter) a úhel blíží se 0° (super-hydrofilní) [39,40, 56, 57].

Dobrá adheze buněk k povrchu materiálu napovídá, že daný materiál je vhodný pro kultivaci buněk a jejich dobré proliferaci. Adheze je však snížena v případě, že je daný povrch hydrofobní. Buňky se na ni špatně přichycují a tedy schopnost růst a rozmnožování je omezena [41].



Obr. 6: Různé typy povrchů rozdělené dle úhlu smáčivosti: a) velmi hydrofobní charakter, b) hydrofilní charakter, c) velmi hydrofilní charakter. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

2.3 Extrakce v roztoku

Extrakce materiálu v roztoku je dalším důležitým testem biokompatibility. Jedná se o test, kdy je charakterizována chemická stránka materiálu, tedy konkrétně jeho složek, které se uvolní do roztoku. Díky jeho dobrým a spolehlivým výsledkům se test provádí před biologickým testováním. Výsledná data jsou pak použita k doplnění celkového obrazu o biokompatibilitě materiálu [42].

2.4 Cytotoxicita

Testování cytotoxicity je jedním z testů biokompatibility prováděný na savcích buňkách v kultuře. Tyto testy jsou velmi podstatné pro testování různých materiálů používaných jako implantáty nebo biosenzory, protože výsledkem je přímo toxicita materiálu na živý organismus [20, 23].

Četnost použití těchto testů a jejich využitelnost v řadě oborů dokazuje jejich obrovský vývoj a zdokonalení v posledních desítkách let, a to protože ve velké míře zastoupily testování *in vivo*. Testy *in vivo* jsou nákladné, zdlouhavé a z morálního hlediska diskutabilní. Proto jsou na testy cytotoxicity kladeny velmi vysoké nároky. Cytotoxické testy musí být rychlé, nenáročné a co nejméně nákladné. Existuje velké množství velmi přesných a zároveň cenově dostupných testů [23].

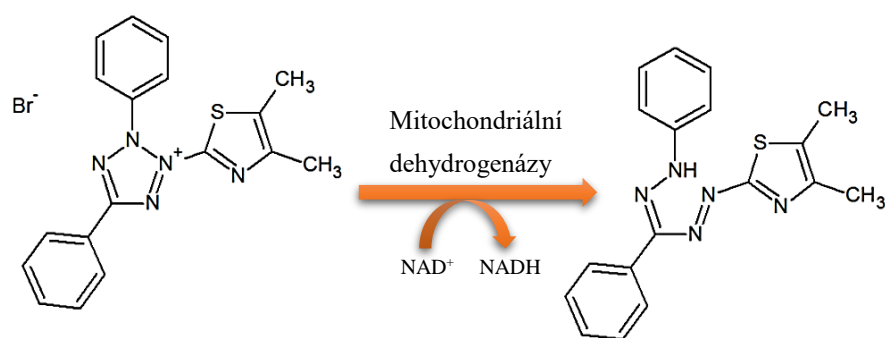
2.4.1 Testy s tetrazoliovými solemi

Tetrazoliové soli jsou kvartérní amoniové soli a používají se ke stanovení viability eukaryotických buněk. Jedná se o strukturně velice podobné látky, které tvoří barevný produkt s absorpčním maximem při různých vlnových délkách. Tyto testy jsou velmi oblíbené díky své jednoduchosti. Jejich princip spočívá v přeměně tetrazoliové soli na barevné formazany. Tento děj se odehrává v mitochondriích, pomocí dehydrogenáz a kofaktorů NADH a NADPH, které

se oxidují. Testy se vyhodnocují na mikrotitračních deskách a výsledky jsou měřeny na spektrofotometru. Snadno měřitelná intenzita zabarvení, respektivě množství barevného formazanu, je přímo úměrná počtu živých buněk. Tyto soli se mohou rozdělit do dvou skupin [25, 26]:

- MTT neboli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromid je pozitivně nabitý a snadno proniká životaschopnými buňkami. Metoda redukce MTT byla prvním testem životaschopnosti buněk vyvinutých pro mikrotitrační desku, která je vhodná pro rychlou analýzu vzorků. Testování s MTT je velmi oblíbenou metodou v laboratořích. O její popularitě svědčí tisíce vědeckých článků. MTT je toxické, škodlivé a citlivé na světlo, proto je třeba ho před světlem chránit [25, 27, 28] .

MTT je žluté barvivo, které se v životaschopných buňkách, díky jejich metabolitům, mění na fialově zbarvený a nerozpustný formazan (*Obr. 7*). Když jsou buňky mrtvé či poškozené, ztrácejí schopnost převést MTT na formazan, takže tvorba barevného formazanu slouží jako užitečný a vhodný ukazatel pouze těch buněk, které jsou viabilní neboli životaschopné. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky [25, 27, 28, 29, 30].



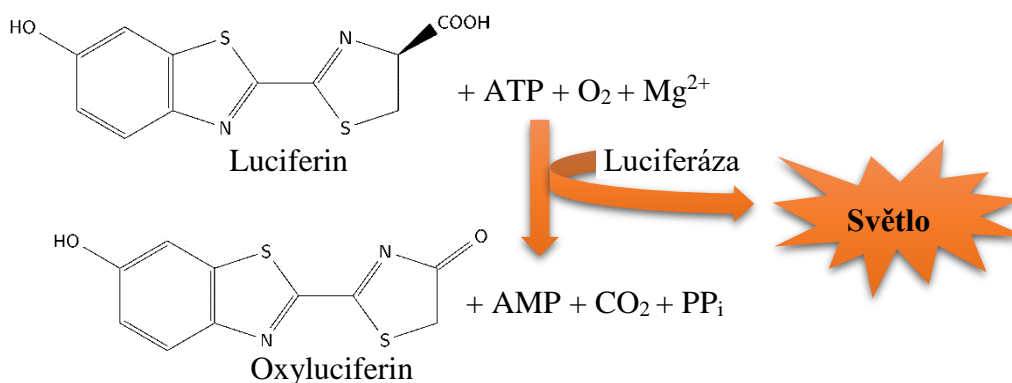
Obr. 7: Rovnice přeměny MTT na barevný formazan. Obrázek byl vytvořen v programu ChemSketch, verze 11.02, © 2008 a upraven v programu PhotoFiltre 7, verze 7. 2.1., © 2015.

- MTS, XTT a WST-1 (celé chemické názvy viz *Seznam použitých zkratek*) jsou negativně nabitě a obtížně vstupují do buňky. Typické je jejich použití s akceptorem elektronů, který usnadní redukci na barevný formazan. Mezi tyto látky patří např.: fenazin metylsulfát (PMS) nebo fenazin etylsulfát (PES) [25, 26].

2.4.2 ATP test

Posouzení činnosti metabolismu prostřednictvím obsahu adenosintrifosfátu (ATP) v buňce je široce používanou metodou pro měření cytotoxicity. ATP tvoří důležitou část metabolismu buněk jako zásoba energie a při poškození ztrácí buňka schopnost udržet potřebnou hladinu ATP. Množství ATP je tedy indikátorem toxicity materiálu [31, 32].

Pro měření množství ATP bylo používáno mnoho metod, ale nejcitlivější a nejspolehlivější technikou je bioluminiscenční metoda založená na reakci luciferinu a luciferázy (*Obr. 8*). ATP se aktivuje měřením světla pomocí tzv. luminometru. Množství vzniklého světla je přímo úměrné množství přítomného ATP v jednom testovaném vzorku [31, 32].



Obr. 8: Schéma reakce přeměny luciferinu na oxyluciferin za vzniku světelného záření.
 Obrázek byl vytvořen v programu ChemSketch, verze 11.02, © 2008 a upraven v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

2.4.3 Fluorimetrický test s propidium jodidem

Propidium jodid (PI) je velmi využívaná fluorescenční sonda, která může vstoupit do buňky pouze poškozenou membránou. V buňce se naváže na báze v dvoušroubovicové nukleové kyselině. Mechanizmy, které chrání nepoškozenou buňku před škodlivými látkami, nedovolí PI vstoupit do buňky a navázat se. Po navázání jodidu na nukleové kyseliny se silně zvyšuje fluorescence až o 20–30ti násobek. Jedná se o test pro detekci mrtvých buněk. Výraznou červenou fluorescencí lze velmi dobře pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu. PI se také používá k průtokové cytometrii, spektrofluorometrii. Nevýhodou této látky je její zařazení do seznamu potenciálních karcinogenů, proto je třeba při práci s touto látkou dbát na bezpečnostní pravidla [33, 34, 35, 36].

2.4.4 Fluorimetrický test s fluorescein diacetátem

Fluorescein diacetát (FDA) je látka nefluoreskující, hydrofobní a proniká do nepoškozených a živých buněk. Hydrolýzou FDA intracelulárními esterázami vzniká hydrofilní a zeleně fluoreskující fluorescein, který se kumuluje v cytoplazmě. Naměřená intenzita fluorescence je přímo úměrná počtu živých buněk, tedy metabolicky aktivním buňkám [37, 38]

3 Buněčné kultury

Nejmenší jednotkou živých systémů, která je schopna samotné existence a vykazuje všechny základní znaky života, je buňka. U mnohobuněčných organismů se buňky stejného druhu sdružují a vytvářejí tkáně a orgány určené pro výkon specifických funkcí. Po izolování buněk z tkáně je mnoho způsobů jak udržet a zvyšovat jejich počet [42, 44].

Zdrojem buněk pro založení kultury je obvykle laboratorní zvíře nebo člověk, méně často se používají kultury buněk hmyzu a rostlinné buněčné kultury. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Po namnožení se buňky naředí a přenesou do nových kultivačních nádob, tento postup se obvykle označuje jako pasáž, a vzniká jím tzv. sekundární kultura čili subkultura. Primární kultura má obvykle omezenou životnost, proto jsou používány tzv. imortalizované buněčné kultury. Jedná se o mutované buňky, u kterých je umožněna časově neomezená reprodukce [45, 46].

Kultivované buňky mají dnes již své pevné a nenahraditelné postavení, protože využití buněčných kultur v experimentální práci má ve srovnání s jinými typy biologických modelů, v porovnání s použitím laboratorního zvířete nebo izolovaného orgánu či tkáně, zásadní výhody. Například experiment probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi [45].

3.1 Kultivace

Řadu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství buněk. Na kultivovaných buňkách lze také jednoduše provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení [45].

Nejdůležitějším požadavkem při kultivaci živočišných buněk je sterilita prostředí, která má při porušení větší důsledky při kultivaci tkáňových buněk ve srovnání s mikrobiálními. Důvodem je zejména podstatně nižší růstová rychlost tkáňových buněk ve srovnání s bakteriálními či kvasničnými buňkami. Aby byla dodržena sterilita, základním předpokladem pro kultivaci tkáňových buněk je laminární box, který zaručuje, že prostředí, ve kterém dochází k manipulaci s buňkami, bude opravdu sterilní [47].

Laminární box neboli flowbox je box vyroben obvykle z nerezové oceli bez spár, ve kterých by se mohly množit spory. Vzduch zde proudí laminárním prouděním a je hnán přes speciální filtry a HEPA filtry. Tyto filtry zajišťují sterilní prostředí bez mikroorganismů [48].

Kromě dalšího vybavení, které je shodné s vybavením mikrobiologické laboratoře je třeba mít k dispozici inkubátor s atmosférou CO₂. Pro uchování buněk je třeba mít k dispozici mrazicí box nebo kontejner na tekutý dusík. Nízké teploty se využívají ke krátkodobému uchovávání především krve, séra, buněk, tkání a orgánů, a to v oblasti 4 °C. Při potřebě dlouhodobé konzervace živých buněk v dusíku se používají kryoprotektiva. Jejich nejznámější zástupci jsou glycerol nebo dimetylsulfoxid [45, 49].

3.2 Médium

Tkáňové buňky se na rozdíl od mikrobiálních buněk pěstují obvykle v tekutém médiu. Většina používaných buněčných linií je adherentní, tedy buňky mají tendenci přilnout na dno misky a růst v jediné vrstvě, proto je nutné dbát při kultivaci na to, aby buňky „nepřerostly“. To znamená, aby nedošlo ke kompletnímu pokrytí na dně misky. V této fázi označené jako 100 % konfluence dochází k zastavení růstu. Pokud jsou buňky nechány dlouho za těchto podmínek, dochází ke ztrátě adherence a tudíž k jejich zakulacování. Takovéto buňky odumírají. Zdravé buňky jsou zpravidla protáhlé a tento tvar buněk dokazuje správnou adhezi ke dnu kultivační misky [42, 47].

Růst živočišných buněk v kultuře vyžaduje médium obsahující esenciální aminokyseliny, vitaminy, peptidové nebo proteinové růstové faktory. Často je třeba ověřit empiricky vhodnost určitého typu média pro nové buňky. V současné době existuje mnoho typů médií, které jsou zařazena do několika skupin, a to na základě typu přidaných látek, například média komplexní (např. RPMI 1640, CMRL 1066, F12), média obsahující sérum, media bez séra, media bez bílkovin a chemicky definované média apod. Mezi chudá média patří např. Eagleovo médium (MEM) a Dulbeccova modifikace Eagleova média (DMEM), které obsahují pouze esenciální aminokyseliny a zdroj energie, vitaminů a solí [47, 43, 52].

Sérum slouží jako zdroj aminokyselin, bílkovin, vitaminů, sacharidů, lipidů, hormonů, růstových faktorů, anorganických solí, stopových prvků a dalších sloučenin. Také zlepšuje kapacitu média pro vyrovnávání pH. Většina buněčných linií roste velmi dobře při pH 7,4 a při poklesu pH na hodnotu 7,0 až 6,5 zpomalují růst. Při nižším pH než 6,5 zpravidla buňky začínají odumírat. Sérum také pomáhá snížit fyzické poškození způsobené manipulací s pipetou a mícháním. Navíc mění podmínky na kultivačním substrátu, což umožňuje adherentním buňkám snadno proliferovat. Mezi séra široce používaná patří bovinní fetální sérum (FBS), dále pak koňské, lidské sérum aj. [47, 43].

3.3 Růstová křivka

Lag fáze (*Obr. 9*) je doba, kdy se buňky přizpůsobují novému prostředí. Buňky se nemnoží, růstová rychlost je nulová, počet živých buněk spíše klesá. Buňky zvětšují svůj objem a aktivuje se jejich enzymový systém. V tomto období jsou buňky velmi citlivé vůči nepříznivým chemickým a fyzikálním vlivům (teplo, chlad, látky s toxickým účinkem). Délka lag fáze je různá. Kolísá podle druhu buněk nebo závisí na typu a složení média [50, 51].

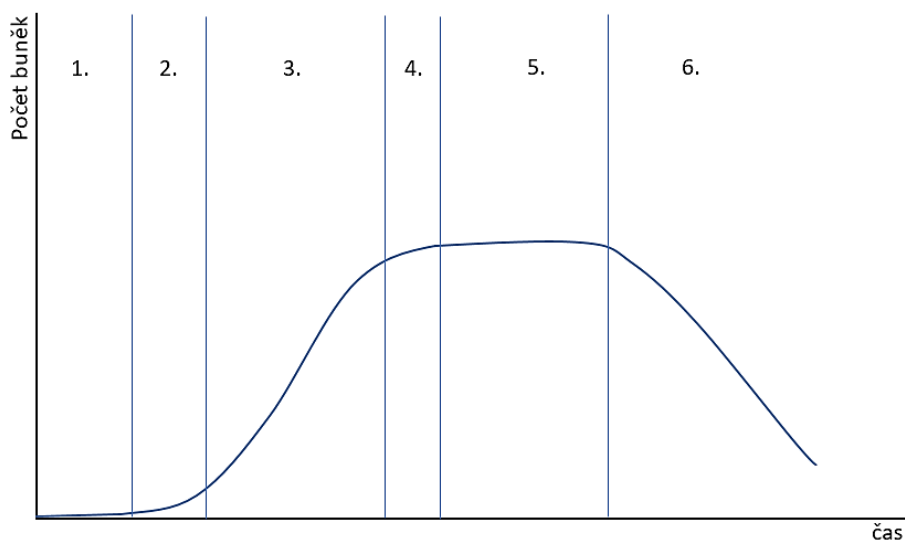
Po lag fázi následuje fáze zrychleného růstu (akcelerační fáze). Buňky, které se úspěšně adaptovaly na podmínky v novém prostředí, se začínají dělit, růstová rychlost se zvyšuje. Z matematického hlediska ji můžeme považovat za extrapolovanou exponenciální fázi vzhledem k velikosti původnímu inokulu [50, 51].

Exponenciální fáze je charakteristická nejkratší generační dobou, která je po čas celé fáze konstantní. Tedy celková hmota množících se buněk a rychlost množení jsou v konstantním

poměru. Dobu exponenciální fáze určuje rychlost ubývající živin a zvyšující se koncentrace odpadních látek. Pokud se buňky z této fáze přenesou do jiného kultivačního média o stejném složení, pokračují buňky v rozmnožování bez zřetelné lag fáze [50, 51].

V důsledku vyčerpání živin a nahromadění metabolitů se snižuje rychlost růstu a nastává krátká a přechodná fáze – fáze zpomaleného růstu a dále pak stacionární fáze. To má za následek hladovění nebo intoxikaci buněk, které přestávají růst, a počet živých buněk se nemění. Tedy je rovnováha mezi přírůstkem a uhynutím starých buněk. Toto stádium rostoucí kultury se označuje, také jako maximální koncentrace [50, 51].

Ve fázi hynutí již je vyšší koncentrace metabolitů než živin. Dochází k velkému úhynu buněk a počet živých rychle klesá. Později se snižuje i absolutní koncentrace buněk jako důsledek autolýzy [50, 51].



Obr. 9: Růstová křivka. 1. Lag fáze, 2. fáze zrychleného růstu, 3. exponenciální fáze, 4. fáze zpomaleného růstu, 5. stacionární fáze, 6. fáze hynutí. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo seznámení se s organickými polovodiči a přístupy testování biokompatibility na úrovni buněčných kultur.

Cílem praktické části bylo posouzení biokompatibility organických materiálů (flavinové materiály, PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie) určených k přípravě biosenzorických zařízení na základě fyzikálních, chemických a biologických vlastností. Konkrétně se jednalo o:

- Měření úhlu smáčení povrchu testovaných materiálů s destilovanou vodou
- Stanovení stability materiálů extrakcí ve fyziologickém roztoku
- Posouzení schopnosti buněk adherovat na povrchu materiálů pomocí mikroskopického pozorování
- Stanovení přímé i nepřímé toxicity materiálů (MTT test, ATP test a fluorescenční test s propidium jodidem (PI) a fluorescein diacetátem (FDA))

PRAKTICKÁ ČÁST

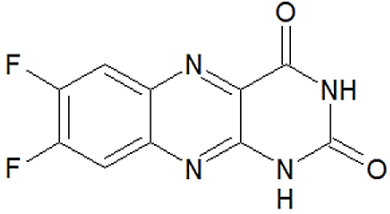
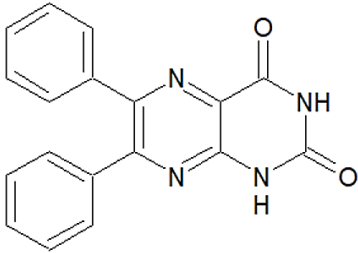
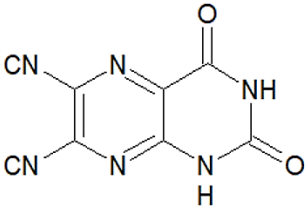
4 Materiál

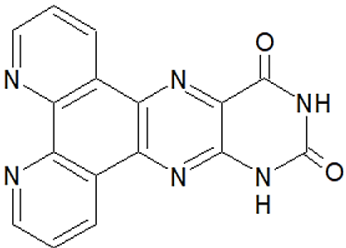
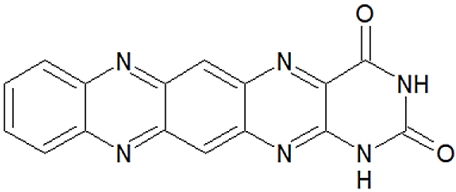
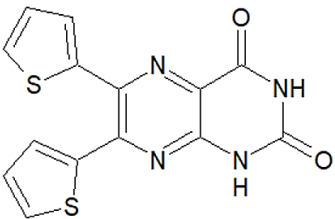
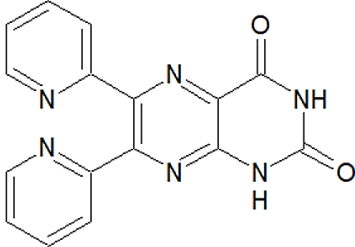
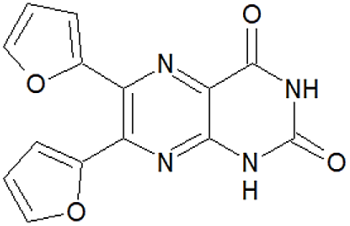
4.1 Organické materiály

Testované organické materiály jsou rozděleny do dvou sad, nově syntetizované analogy flavinů a již komerčně prodávané materiály (PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie). Testované materiály byly naneseny na krycí sklo o průměru 15 mm. V případě polyetylnaftalát (PEN) folie byl použit 15 mm kruh z tohoto materiálu. Vzorky byly připraveny v laboratořích Chemické fakulty Vysokého učení technického v Brně.

– Flavinové analogy [54]

Tabulka 1: Souhrnný přehled analogů flavinu. V tabulce je uveden název, kód, sumární vzorec, molekulární hmotnost a strukturní vzorec. Struktury jsou vytvořeny v programu ChemSketch, verze 11.02, © 2008.

Popis	Struktura
Název: 8,9-Difluoronaphtho[2,3-g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione Kód: L/21 Vzorec: $C_{10}H_4F_2N_4O_2$ Molekulární hmotnost: 250,16 g/mol	
Název: 6,7-Diphenylpteridine-2,4(1H,3H)-dione Kód: L/24 Vzorec: $C_{18}H_{12}N_4O_2$ Molekulární hmotnost: 316,31 g/mol	
Název: 2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridine-6,7-dicarbonitrile Kód: L/31 Vzorec: $C_8H_2N_6O_2$ Molekulární hmotnost: 214,14 g/mol	

<p>Název: pteridino[6,7-f][1,10]phenantroline-11,13(10H,12H)-dione</p> <p>Kód: L/43</p> <p>Vzorec: $C_{16}H_8N_6O_2$</p> <p>Molekulární hmotnost: 316,27 g/mol</p>	
<p>Název: Pteridino[6,7-b]phenazine-2,4(1H,3H)-dione</p> <p>Kód: L/48</p> <p>Vzorec: $C_{16}H_8N_6O_2$</p> <p>Molekulární hmotnost: 316,27 g/mol</p>	
<p>Název: 6,7-Di(thiophen-2-yl)pteridine-2,4(1H,3H)-dione</p> <p>Kód: L/55</p> <p>Vzorec: $C_{14}H_8N_4O_2S_2$</p> <p>Molekulární hmotnost: 328,37 g/mol</p>	
<p>Název: 6,7-Di(pyridin-2-yl)pteridine-2,4(1H,3H)-dione</p> <p>Kód: L/66</p> <p>Vzorec: $C_{16}H_{10}N_6O_2$</p> <p>Molekulární hmotnost: 318,29 g/mol</p>	
<p>Název: 6,7-Di(furan-2-yl)pteridine-2,4(1H,3H)-dione</p> <p>Kód: L/67</p> <p>Vzorec: $C_{14}H_8N_4O_4$</p> <p>Molekulární hmotnost: 296,24 g/mol</p>	

- **Poly(3,4-ethylenedioxythiophen) s uhlíkovými nanotrubičkami (PEDOT CNT) [55]**
- **Uhlíková pasta**
kat. č. C2050503P1, Gwent.
(http://www.gwent.org/gem_data_sheets/polymer_systems_products/heat_curable_polymeric_systems/carbon_adhesives/c2050503p1_curable_carbon_ink.pdf)

- **Polyethylennaftalátová (PEN) folie**

Jedná se o polyethylennaftalátový film (AKAFLEX PENCL HT, Gatema).
(<https://www.krempel-group.com/en/solutions/electronic-materials/electronic-materials-for-printed-circuits/>)

4.2 Buněčná linie

Pro experimenty byly použity buňky 3T3 myší fibroblasty (Sigma-Aldrich, kat. č. 93061524).

4.3 Použité chemikálie a jejich složení

- **Agarosa**

Electran, kat. č. 438795A

- **ATP reagent**

Naředěn 1:2 lyzačním roztokem, sterilně a bez přístupu světla, ATP Kit - BioTherma, kat. č. 150-050

- **Destilovaná voda**

Měrná vodivost < 15 MΩ/cm²

- **DMEM**

Kultivační médium, HyClone, kat. č. SH30284.01, obohaceno o fetální bovinní sérum, PAA Clone, kat. č. A15-102, 10 % z celkového objemu a antibiotikum penicilin/streptomycin, Gibco, kat. č. 15140122, 1 % z celkového objemu.

- **Ethanol**

Lachema, 96 %, p.a.

- **Fluorescein diacetát (FDA)**

Sigma-Aldrich, kat. č. F7378

- **Hemasol**

Fyziologické médium, Hemax diagnostik, kat. č. 110815

- **Lyzační roztok**

Lyzační pufr pro ATP test: Somatic cell, Sigma, kat. č. FLSA-1 VL

- **MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromid)**

Sigma-Aldrich, kat. č. A00382

- **PBS**

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok, který je složen ze 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ a destilované vody, pH = 7,4

- **PBS+EDTA**

Fyziologický roztok pufovaný fosfátem s kyselinou ethylendiamintetraoctovou, obsahuje 136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 1,07 mM Na₂EDTA·2H₂O a destilovanou vodu, pH = 7,4

- **Propidium jodid (PI)**

Sigma-Aldrich Fluka, kat. č. 81845

- **Triton X-100**
10 % roztok v 0,1 M HCl, Fluka, kat. č. 93420
- **Trypsin**
Gibco, kat. č. 15090-046

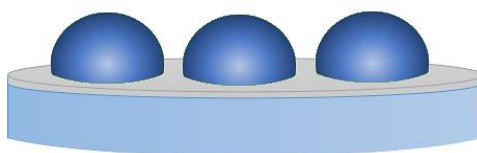
5 Přístroje a zařízení

- **Centrifuga** (Centrifuga 5417R - Eppendorf, Německo)
- **Cytometr** (CASY TT - Roche, Innovatis AG, Švýcarsko)
- **Digitální fotoaparát** (Nikon Coolpix995 - Nikon, Japonsko)
- **Fluorescenční mikroskop** (Zeiss AxioObserver Z1)
- **Inkubátor** (Sanyo - Japonsko)
- **Laminární box** (NuAire, Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., Velká Británie)
- **Luminometr** (Luminometr LM-01-T – Immunotech, Česká republika)
- **Mikrokamera** (Dino-lite – AnMo Electronics Corporation, Tchajwan)
- **Mikropipety** (Nichipet EX – Japonsko)
- **Minitřepačka** (MS 3 basic Minitřepačka – IK®A – Werke GmbH&CO.KG, Německo)
- **Pipetus** (Swiftpet Pro – Polsko)
- **Spektrometr** (Infinite model M200 – Tecan, Rakousko)
- **Světelný mikroskop** (Nikon Eclipse TS100 – Nikon, Japonsko)
- **Třepačka** (Vortex Lab dancer virio, yellow line – Německo)

6 Postupy použitých metod ke stanovení biokompatibility materiálu

6.1 Úhel smáčení

Úhel smáčení byl změřen a vyhodnocen pomocí fotografií z mikrokamery Dino-lite. Za použití programu DinoCapture (DinoCapture 2.0, <https://www.dinolite.us/dinocapture>, © 2016), byl vyfocen materiál, na kterém byly napipetované tři kapky destilované vody o objemu 5 μl (Obr. 10). Tyto fotografie se vložily a upravily v programu ImageJ (ImageJ 1.52, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, © 2016) se zásuvným modulem Contact Angle (ContactAngle, Brugnera M., © 2016), který vyhodnotil výsledný úhel smáčení θ pro daný materiál. Jako kontrolní materiál bylo použito krycí sklo (P-lab, Česká republika).

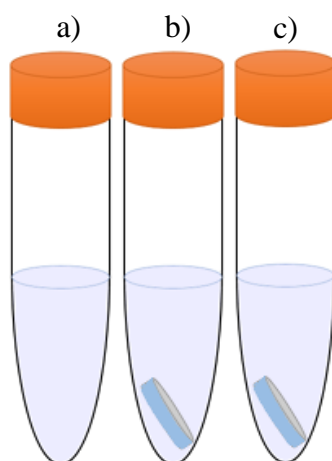


Obr. 10: Znázornění testu měření úhlu smáčení: Materiál nanesený na krycím skle s kapkami destilované vody. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

6.2 Extrakce materiálu v PBS pufru

Příprava byla prováděna sterilně v laminárním boxu. Do 50 ml zkumavky (TPP, Švýcarsko) bylo napipetováno 5 ml roztoku PBS a do tohoto roztoku byl ponořen sledovaný materiál. Extrakce byla provedena pro každý materiál 2x (dvě zkumavky pro jeden materiál) (Obr. 11). Zkumavky byly uzavřeny a inkubovány 48 h při teplotě 37 °C.

Po uplynutí inkubační doby byly extrakty v PBS proměřeny na spektrometru při vlnové délce 230–400 nm. Jako blank byl použit PBS vystavený stejným podmínkám, proměřena byla i destilovaná voda, která sloužila jako kontrolní roztok pro PBS.



Obr. 11: Znázornění testu extrakce v roztoku PBS: a) blank, b)-c) sledovaný materiál nanesený na krycím skle/folii. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

6.1 Kultivace buněčné kultury

Na začátku každé pasáže byla podrobena buněčná linie kontrole pod světelným mikroskopem. Byla kontrolována míra pokrytí kultivační misky buňkami a také zda nedošlo k mikrobiální kontaminaci. Pasáž byla provedena vždy při 70–90 % pokrytí kultivační misky.

Další práce s buňkami byla prováděna sterilně v laminárním boxu. Sterilní prostředí bylo zajištěno UV světlem, které bylo zapnuto před zahájením práce v laminárním boxu. Všechny roztoky byly temperovány na teplotu 37 °C.

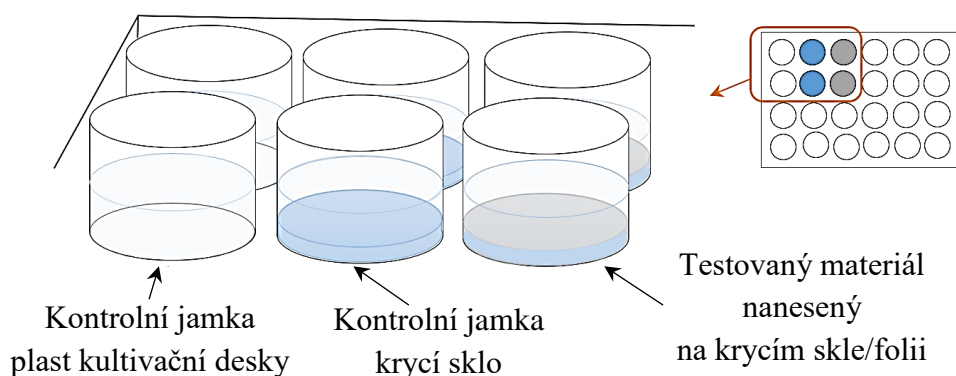
Z misky obsahující buněčnou kulturu bylo odsáno kultivační médium. Opatrně se přidalo 5 ml PBS+EDTA, roztok byl promíchán a odsán. Napipetovalo se 500 µl trypsinu a kultivační miska byla ponechána 2 minuty při 37 °C. Vyšší teplota podporuje účinnost trypsinu. Dále byly buňky zkontrolovány na světelném mikroskopu, zda mají kulatý tvar. To znamená, že se uvolnily z povrchu kultivační misky. Trypsin byl neutralizován 1000 µl kultivačního média. Buněčná suspenze byla promíchána. Nová kultivační miska (TPP, Švýcarsko) byla řádně popsána a bylo do ní napipetováno 10 ml kultivačního média a potřebné množství buněčné suspenze. Nová kultivační miska byla vložena do CO₂ inkubátoru v následujících podmínkách: 37 °C, 5 % CO₂ a 100 % vzdušná vlhkost. Pasáž se opakovala jednou za 2–3 dny.

6.2 Schopnost materiálu umožnit adhezi buněk

Tato schopnost byla posuzována z fotografií buněčné kultury ze světelného mikroskopu. Buňky byly inkubovány na materiálu 48 h při 37 °C. Dle jejich protáhlého tvaru a množství, při srovnání s kontrolou, lze předběžně určit, zda bude daný materiál vhodný pro další testy. Pokud mají buňky kulatý tvar, nedošlo k adhezi buněk na povrch materiálu. To znamená, že materiál není vhodný kvůli jeho vlastnostem (materiál je hydrofobní, vysoce hydrofilní aj.).

6.3 MTT test

Všechny roztoky, se kterými se pracovalo, byly sterilní a byly dopředu vytemperovány na 37 °C. Pro sterilizaci sledovaných materiálů byl do jedné Petriho misky (TPP, Švýcarsko) napipetován ethanol a do druhé destilovaná voda. Pinzetou byl nabrán materiál, vložen do etanolu, promyt v destilované vodě a aktivní stranou nahoru byl vložen do 24-jamkové desky (TPP, Švýcarsko). Takto se pokračovalo se všemi materiály. První jamka byla vždy vynechána. Povrch zde tvořil plast, který je optimální pro růst buněk, a sloužil jako kontrolní povrch. Do druhé jamky se vkládá krycí sklo (P-lab, Česká republika), to také slouží jako kontrolní materiál (*Obr. 12*). Do třetí a následujících jamek byly vloženy testované materiály, které jsou naneseny na 15 mm krycím skle. Každý povrch, tedy materiál, měl 2 opakování. Dále byly všechny jamky s materiály propláchnuty PBS, které bylo následně důkladně odsáno. Deska byla popsána a zavřena víkem.



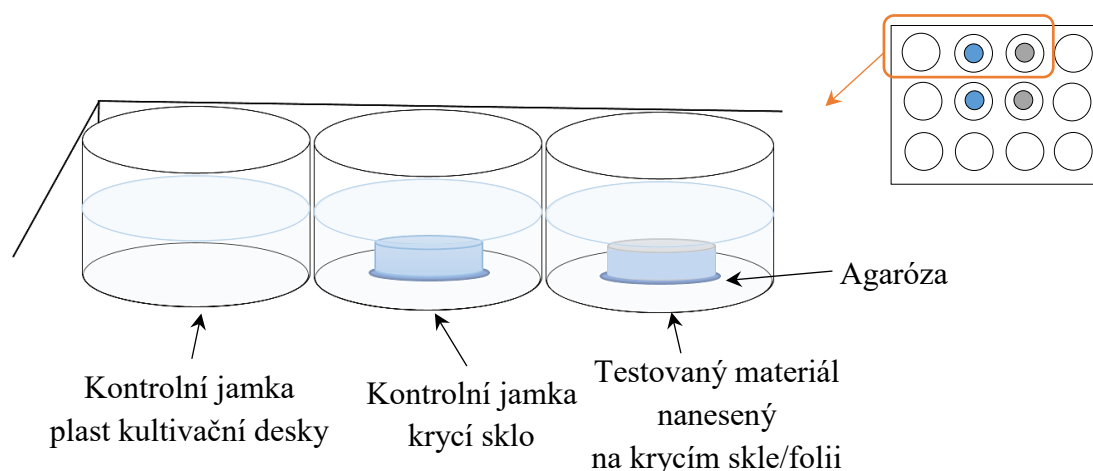
Obr. 12: Znázornění MTT testu: výřez části 24-jamkové kultivační desky. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

Dále byla provedena pasáž buněčné linie (*kapitola 6.1*). Vzniklá buněčná suspenze byla přepipetována do 15 ml zkumavky (TPP, Švýcarsko). Z této suspenze bylo napipetováno 20 μ l do 10 ml hemasolu. Roztok hemasolu s buňkami byl vložen do cytometru, kde byl zjištěn počet buněk v 1 ml. Množství bylo přepočítáno, tak aby na jamku byla přidána buněčná suspenze 30 000 buněk. Do jednotlivých jamek bylo přidáno 500 μ l kultivačního média a vypočítané množství buněčné suspenze (z 15 ml zkumavky). Takto připravená kultivační deska byla na 48 h ponechána v CO₂ inkubátoru.

Po uplynutí 48 h bylo do každé jamky napipetováno 25 μ l MTT o koncentraci 2,5 mg/ml. Deska byla vložena na 4 h zpět do CO₂ inkubátoru. Po 4 h inkubace bylo odsáto médium s MTT a do každé jamky bylo přidáno 300 μ l 10% Tritonu X-100. Deska se nechala na 5 min třepat na třepačce. Pokud se materiál uvolnil ze sklíček, bylo nezbytné roztoky centrifugovat 5 minut při 27 °C a 5000 g. Roztoky byly po 50 μ l napipetovány na 96-mikrotitrační desku. Deska byla vložena do spektrometru a byla změřena absorbance při 570 nm. Výsledky byly zpracovány v programu Excel.

6.4 Test nepřímé toxicity

Jedná se o obdobu MTT testu. Od klasického MTT testu se liší v tom, že materiály na 15 mm krycím skle byly vkládány do 12-jamkové kultivační desky (TPP, Švýcarsko, průměr jamky 22 mm) a přilepeny 5 μ l 2% agarózovým gelem (*Obr. 13*), aby materiál nebyl nadnášen médiem. Do jamek bylo napipetováno dvojnásobné množství média (1 ml) a bylo vkládáno dvojnásobné množství buněčné suspenze (60 000 buněk). Posledním bodem, ve kterém se liší od klasického MTT testu, je při vyhodnocení. Před přidáním MTT jsou z jamek vyjmuty materiály. Postup byl v ostatních bodech totožný s MTT testem (*kapitola 6.3*).



Obr. 13: Znáznornění testu nepřímé toxicity: výřez 12-jamkové kultivační desky. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

6.5 ATP test

Založení testu probíhá stejně jako u MTT testu (*kapitola 6.3*). Připravená 24-jamková deska s testovanými materiály a buňkami se nechá 48 h inkubovat při 37 °C.

Po uplynutí této doby se pokračuje s vyhodnocením. V této fázi se pracovalo sterilně a s omezením přístupu světla, neboť lyzační roztok i ATP reagent jsou velmi citlivé na světlo. Byl připraven lyzační roztok, který byl naředěn 10x destilovanou vodou a uchován při 4 °C. Z jamkové desky bylo odsáto kultivační médium a na každou jamku napipetováno 250 μ l vychlazeného lyzačního roztoku.

Další části postupu probíhaly již mimo box. Deska byla zabalena do alobalu a nechána třepat 15 minut na třepačce. V případě potřeby byly roztoky centrifugovány (5000 g, 4 °C a 5 minut). 100 μ l vzorku v duplikátech bylo napipetováno na 96-jamkovou desku z neprůhledného materiálu. Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l ATP reagentu. Deska byla vložena do přístroje, změřena luminiscence a výsledky byly vyhodnoceny v programu Excel.

6.6 Detekce viability pomocí fluorescenčního mikroskopu

Založení testu probíhá stejně jako u MTT testu (*kapitola 6.3*). Připravená 24-jamková deska s testovanými materiály a buňkami byla ponechána 48 h inkubovat při 37 °C.

Vyhodnocení se provádělo rychle, aby se omezila fotodegradace fluorescenčních sond. Bylo napipetováno 0,5 μ l FDA (2 μ g/ml) a 5 μ l PI (20 μ g/ml) na jamku. Deska byla vložena do fluorescenčního mikroskopu a byly nafoceny snímky buněk při světle o různých vlnových délkách (GFP – Filter set 43 HE, RFP – Filter set 38 HE, Zeiss, Jena, Německo).

7 Výsledky testů

Biokompatibilita byla stanovována u dvou sad testovaných organických materiálů, jejich přesný popis a seznam byl zmíněn dříve (*kapitola 4.1*), přehled provedených testů v tabulce níže (*Tab. 2*).

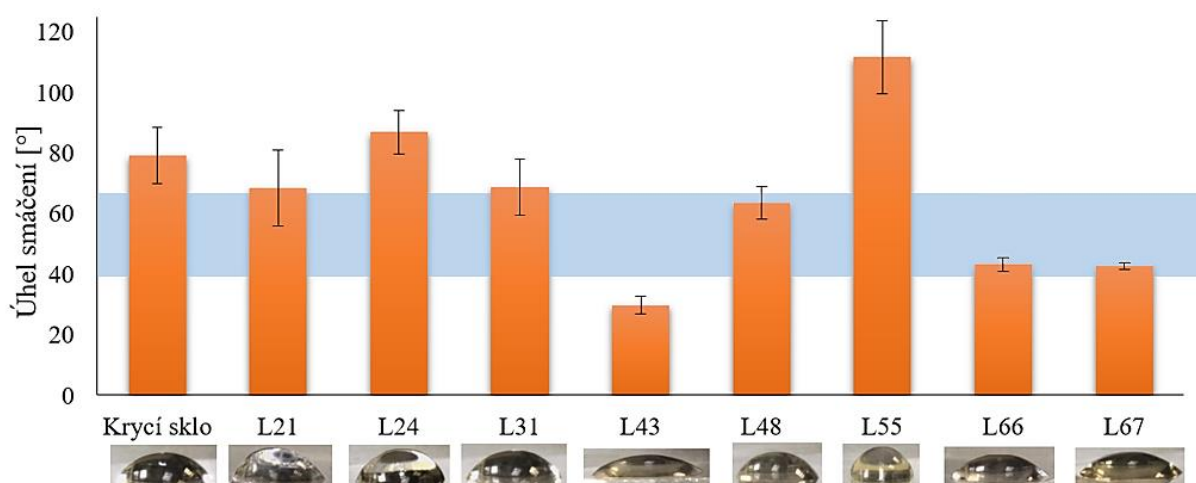
Tab. 2: Celkový přehled vzorků a testů, kterým byly podrobeny sledované materiály. Nejprve byly provedeny předběžné testy biokompatibility (úhel smáčení, extrakce materiálu v PBS pufru – stabilita materiálu v roztoku, adheze buněk na povrch materiálu) a dále byly provedeny testy s buněčnou kulturou (test nepřímé toxicity, toxicita materiálu – MTT test, ATP test, stanovení viability buněk pomocí PI a FDA). Přesné složení sledovaných materiálů (*kapitola 4.1*). Symbol ● znamená, že charakteristika materiálu byla určována pomocí daného testu.

	Úhel smáčení	Stabilita materiálu v roztoku	Adheze buněk na povrch materiálu	Test nepřímé toxicity (MTT test)	Toxicita materiálu (MTT test)	Toxicita materiálu (ATP test)	Viabilita buněk (PI, FDA)
Flavinové materiály	●		●	●	●		
PEDOT CNT		●	●		●		●
Uhlíková pasta			●		●	●	
PEN folie		●	●		●	●	●

7.1 Úhel smáčení

Úhel smáčení vypoví o charakteru povrchu sledovaného materiálu vůči kapalině, zde destilovaná voda. Buňky mohou adherovat na povrchy s úhlem smáčení mezi 30–110°. Optimální adheze je dosaženo v rozmezí 40–65° [56]. Nevhodné prostředí pro adhezi je vytvořeno povrchem s úhlem smáčení nad 110° (hydrofobní charakter) a pod 30° (vysoce hydrofilní charakter) [57].

Byly zjištěny úhly smáčení jednotlivých flavinových materiálů (*Graf 1*). Jako srovnávací materiál bylo použito krycí sklo, jeho úhel smáčení vyšel $(79,3 \pm 9,2)^\circ$. Největší úhel smáčení $(111,7 \pm 12,1)^\circ$ měl materiál L55, naopak nejmenší úhel smáčení byl naměřen u materiálu L43, tedy $(29,8 \pm 3,0)^\circ$. Materiály L48, L66 a L67 vykazovaly úhel smáčení optimální pro adhezi buněk.

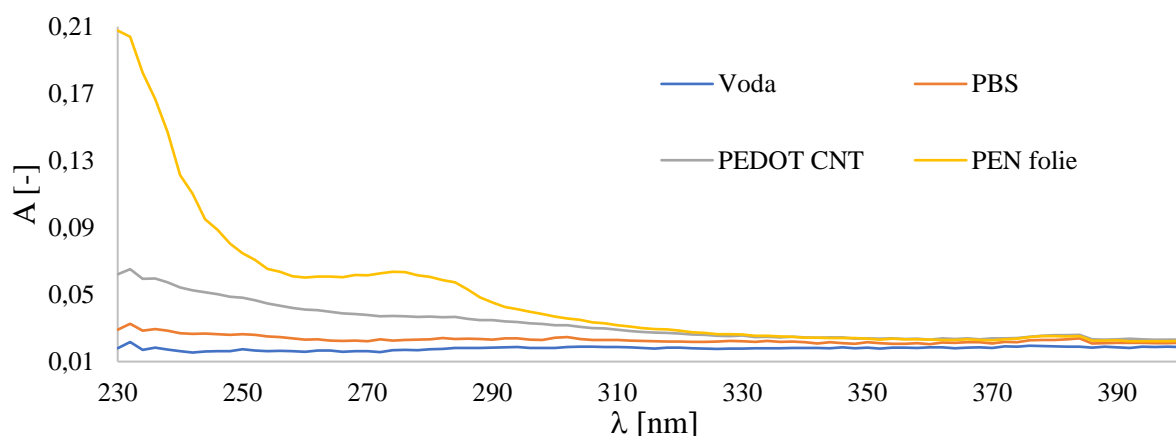


Graf 1: Naměřené úhly smáčení pro flavinové materiály a přiložené obrázky pro jednotlivé materiály, modrý pás značí optimum pro adhezi buněk. Úhel smáčení byl měřen z kapky destilované vody (5 μ l). Vložené obrázky ukazují typické tvary kapek na jednotlivých materiálech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako úhel smáčení \pm směrodatná odchylka, N = 6. Graf byl vytvořen v programu Excel a upraven v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

7.2 Extrakce materiálu v PBS pufru

Tímto testem se stanovila stabilita sledovaného materiálu a zjišťovalo se, zda do PBS (pufrovaný fyziologický roztok), uvolňuje sledovaný materiál chemické látky absorbující v blízké oblasti UV záření. Pokud test vyjde pozitivně a materiál uvolňuje chemické látky, je třeba provést další analýzy, zda jsou tyto látky toxické pro buněčnou kulturu [58, 59].

Zkoumané materiály byly ponořeny na 48 h do roztoku PBS v uzavřené zkumavce při 37 °C. Jako blank byl použit PBS, který byl vystaven stejným podmínkám jako materiály. Proměřena byla i destilovaná voda.



Graf 2: Výsledek extrakce materiálů v PBS. Hodnoty jsou výsledkem uvolněných látek do roztoku PBS (pH = 7,4), ve kterém byly materiály inkubovány 48 h při 37 °C. Absorbance byla změřena

v intervalu 230–400 nm. Jako blank bylo použito PBS vystavené stejným podmínkám. Destilovaná voda byla měřena jako kontrolní roztok pro PBS. A = absorbance, λ = vlnová délka.

Z grafu (*Graf 2*) je patrné, že PEN folie během 48 hodin při 37 °C uvolnila chemické látky, výrazně absorbující při vlnové délce 230–310 nm, do roztoku PBS. Největší absorbanci měly tyto látky při 230 nm a při 275 nm, kdy dosáhla hodnoty 0,2040 a 0,0635. Na základě literatury bylo zjištěno, že zvýšená absorbance by mohla být způsobena přítomností naftalenu ve struktuře PEN [60, 61]. Výsledkem tohoto testu bylo zjištění omezené stability PEN folie ve fyziologickém roztoku.

Látky extrahované z materiálu PEDOT CNT dosahují nízkých hodnot absorbance. Z toho lze usoudit, že jejich množství bude pravděpodobně zanedbatelné.

7.3 Adheze buněk

3T3 myší fibroblasty jsou buňky, které mají při vhodných podmínkách protáhlé, vřetenovité nebo hvězdčité tělo, jejichž výběžky se přimykají (adherují) k povrchu kultivační nádoby [53]. Tyto vlastnosti obecně závisí na interakci buněk s povrchem materiálu. Nejvhodnější povrch pro adhezi buněk tvořil plast kultivačních misek. Z tohoto důvodu jsou při testech (např. MTT, ATP aj.) používány hodnoty z prostředí kultivačního plastu jako kontrolní a srovnávací. Výsledkem tohoto testu byly fotografie (*Obr. 14, Obr. 15*) buněčné kultury ze světelného mikroskopu. Inkubace buněk trvala 48 h.

7.3.1 1. sada testovaných materiálů – Flavinové analogy

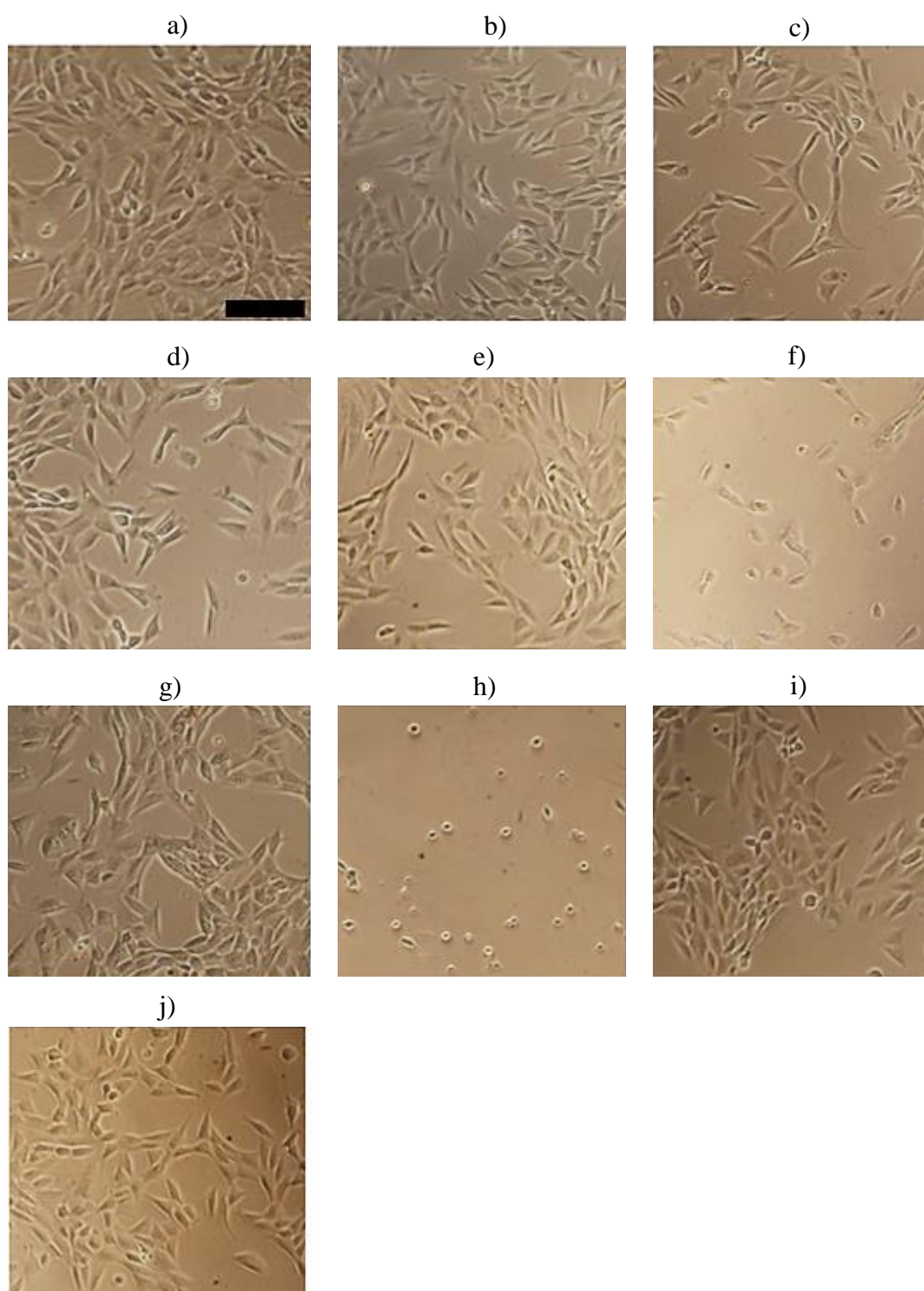
Obr. 14 a) ukazuje buňky kultivované na plastu kultivační misky. Mají protáhlý tvar a vytvářejí cytoplazmatické výběžky. Je zde také malé množství kulatých špatně adherovaných buněk. Protáhlý tvar je typický pro použité buňky [53].

3T3 myší fibroblasty kultivované na skle *Obr. 14 b)* sloužily jako druhá kontrola pro testované materiály, jelikož jsou materiály naneseny na skle. Tvar buněk je srovnatelný s buňkami rostoucími na plastu. Na skle bylo adherováno menší množství buněk, to vypovídá o nižší biokompatibilitě skla.

Množství a morfologie buněk byly na flavinových materiálech *Obr. 14 c)-e), g), i)-j)* srovnatelné s kontrolami. Tyto materiály mohou být zařazeny mezi vhodné materiály pro kultivaci

Naproti tomu kulatý tvar a nízký počet buněk na materiálu L43 *Obr. 14 f)* dokazuje, že tento materiál nebyl vyhovující pro kultivaci buněk z důvodů snížené adheze buněk na povrchu materiálu.

Na dalším obrázku *Obr. 14 h)*, kde se nachází materiál L55, je viditelný kulatý tvar buněk, dá se odvodit, že většina buněk je již uhynulá nebo špatně adherovaná. K adhezi docházelo jen u minima buněk.



Obr. 14: Fotografie buněčných kultur (3T3 myší fibroblasty) ze světelného mikroskopu.
Měřítka snímků je 100 μm . Kultivace trvala 48 h. a) plast kultivační desky, b) krycí sklo, c) L21, d) L24, e) L31, f) L43, g) L48, h) L55, i) L66, j) L67. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1., © 2015.

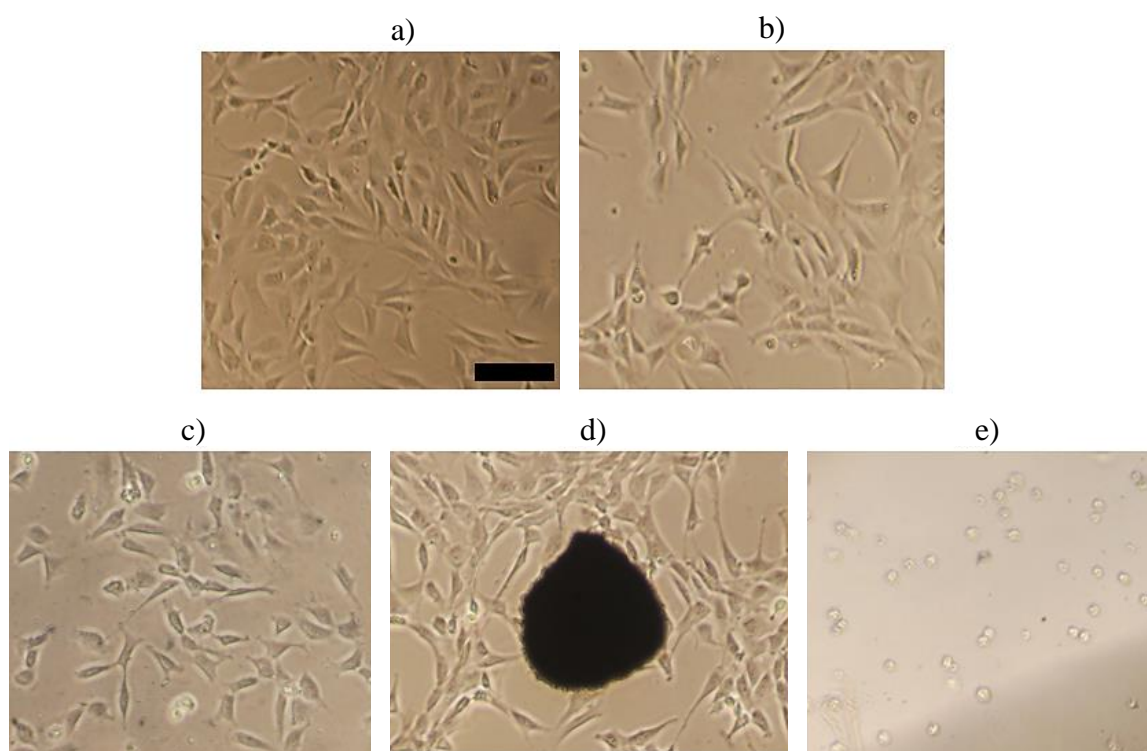
7.3.2 2. sada testovaných materiálů – PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie

Na *Obr. 15 a) a b)* jsou kontrolní jamky – plast kultivační desky a krycí sklo. Velký počet protáhlých buněk je důkazem dobré adheze. Menší počet buněk na krycím skle je důsledkem nižší biokompatibility skla, které bylo použito jako kontrola, protože testované materiály (PEDOT CNT a uhlíková pasta) jsou nanášeny na krycí sklo.

Na následujícím *Obr. 15 c)* je buněčná kultura rostoucí na materiálu PEDOT CNT. Množství buněk bylo srovnatelné s kontrolními variantami, ale tvar nebyl optimální. Byly spíše menší a více zakulacené oproti buňkám na plastu.

Na dalším *Obr. 15 d)* byla uhlíková pasta, která nepokrývala celou plochu krycího skla, na kterém byla nanášena. Schopnost adheze buněk přímo na materiálu, lze odvodit z buněk v těsné blízkosti. Mají protáhlý tvar a srovnatelné množství s kontrolními jamkami.

Poslední materiál *Obr. 15 e)* byla PEN folie. Všechny buňky měly kulatý tvar, z čehož lze usoudit, že byly mrtvé nebo špatně adherované. To ukazuje, že biokompatibilita materiálu je nízká.



Obr. 15: Fotografie buněčných kultur (3T3 myší fibroblasty) ze světelného mikroskopu.

Měřítka snímků je 100 μm . Kultivace trvala 48 h. a) plast kultivační desky, b) krycí sklo, c) PEDOT CNT, d) uhlíková pasta (jedná se o neprůhledný materiál, který nepokrýval celou plochu krycího skla, na kterém byla nanášena), e) PEN folie. Obrázek byl vytvořen v programu PhotoFiltre 7, verze 7.2.1.,

© 2015.

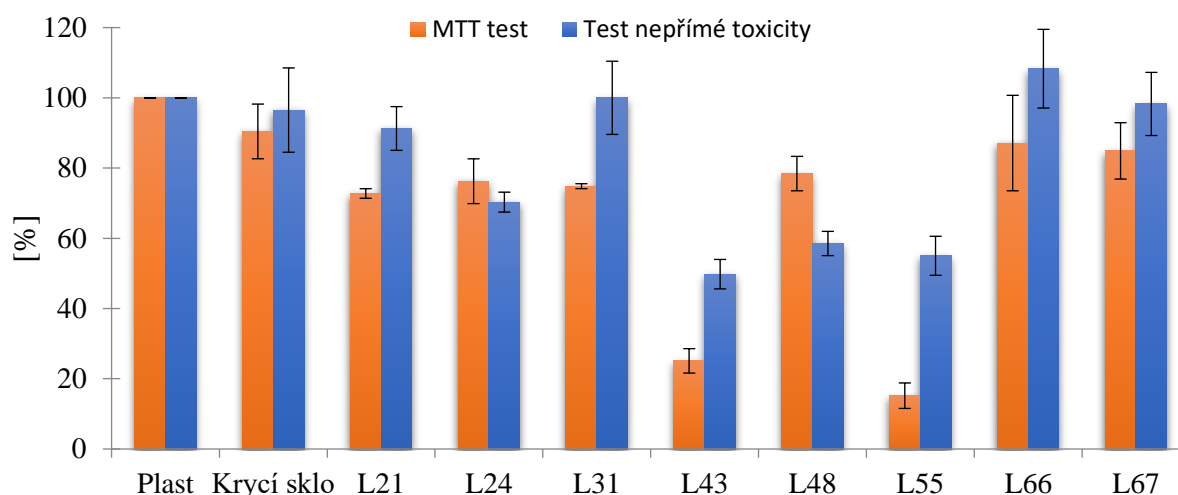
7.4 Testy cytotoxicity

Data jsou prezentována u všech testů cytotoxicity jako relativní hodnoty, 100% představuje analytický signál pro buňky na standardním kultivačním plastu. Pro tyto testy byly použity 3T3 myší fibroblasty.

7.4.1 1. sada testovaných materiálů – Flavinové analogy

Dle návodu (*kapitola 6.3*) byl založen MTT test a buněčná kultura byla inkubována 48 h při 37 °C. Po uplynulé době byla na 96-mikrotitrační desce změřena absorbance roztoků vzniklého formazanu. Absorbance byla přímo úměrná množství živých buněk v jamce, protože formazan je vytvářen pouze buňkami, které jsou metabolicky aktivní [30].

Pro upřesnění vlastností flavinových materiálů byl proveden test nepřímé toxicity (*kapitola 6.4*). Jedná se o variantu MTT testu. Materiál byl nanesen na 15 mm krycím skle a umístěn v jamce o průměru 22 mm. Test hodnotil životaschopnost buněk, které nebyly v přímém kontaktu s materiálem. Tímto testem se zjišťovalo, zda daný materiál uvolňuje toxické látky do prostředí.



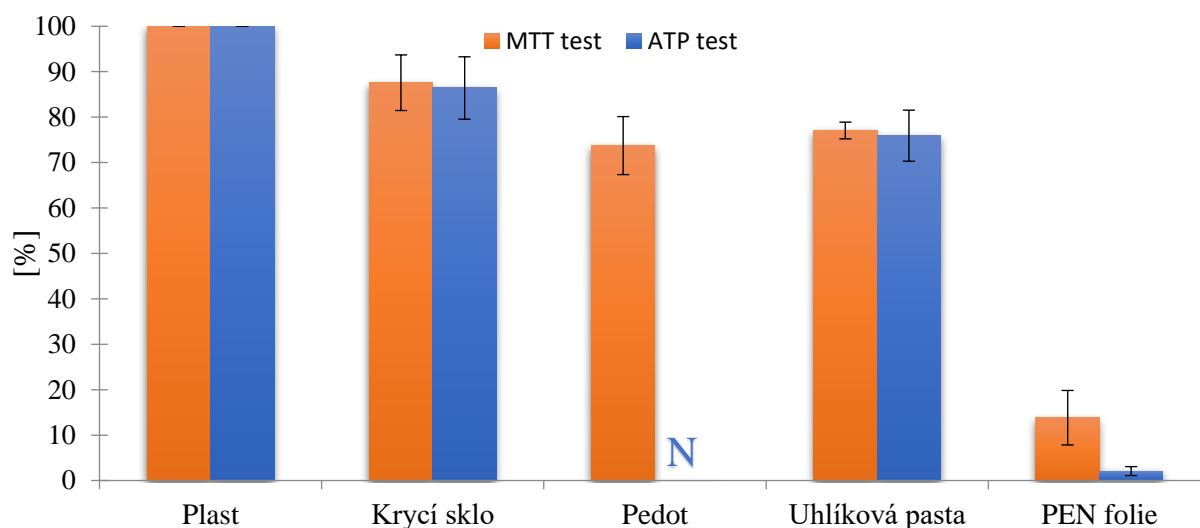
Graf 3: Relativní viabilita buněk inkubovaných na flavinových materiálech stanovená MTT testem a testem nepřímé toxicity. Inkubace proběhla 48 h při 37 °C. Byla použita buněčná kultura 3T3 myší fibroblasty. Data jsou prezentována, jako relativní hodnoty 100% představuje analytický signál pro buňky na standardním kultivačním plastu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 2.

Buněčná kultura 3T3 myších fibroblastů měla na většině testovaných materiálů srovnatelnou relativní viabilitu s kulturou na skle, dosáhla mezi 70–90% (*Graf 3*). To je důkazem netoxicity většiny flavinových analogů. Pouze u L43 a L55 bylo dosaženo nízkého procenta relativní viability, konkrétně L43 = $(24,4 \pm 3,5) \%$ a L55 = $(14,9 \pm 3,6) \%$, hodnoty ostatních flavinových analogů srovnatelných se sklem: L21 $(72,8 \pm 1,4) \%$, L24 $(76,3 \pm 6,4) \%$, L31 $(74,9 \pm 0,7) \%$, L48 $(78,4 \pm 3,5) \%$, L66 $(87,1 \pm 13,6) \%$ a L67 $(84,9 \pm 8,0) \%$.

U testu nepřímé toxicity bylo dokázáno, že za sníženou biokompatibilitu materiálu L43 a L55 zodpovídá i uvolňování toxických látek do prostředí.

7.4.2 2. sada testovaných materiálů – PEDOT CNT, uhlíková pasta, PEN folie

Společně s MTT testem byl proveden doplňkový test ATP. Založen byl dle návodu (*kapitola 6.5*). Po 48 h kultivaci byl do každé jamky přidán lyzační roztok s ATP reagent a vzniklé světlo bylo změřeno luminometrem. Výsledky relativní viability v ATP testu by měly odpovídat výsledkům v MTT testu, jelikož se u obou měří množství metabolicky aktivních buněk. U ATP testu se jedná o množství intracelulárního ATP, které je přímo úměrné množství živých buněk [63].



Graf 4: Viabilita buněk kultivovaných na sadě materiálů stanovená MTT testem a ATP testem. Inkubace trvala 48 h při 37 °C. Byla použita buněčná kultura 3T3 myších fibroblastů. Analytický signál pro plast kultivační misky byl definován jako 100 % relativní viability buněčné kultury. Hodnoty jsou prezentovány jako průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=3. U materiálu PEDOT CNT nebyl měřen ATP test z důvodu, že materiál interferoval s testem, označeno N.

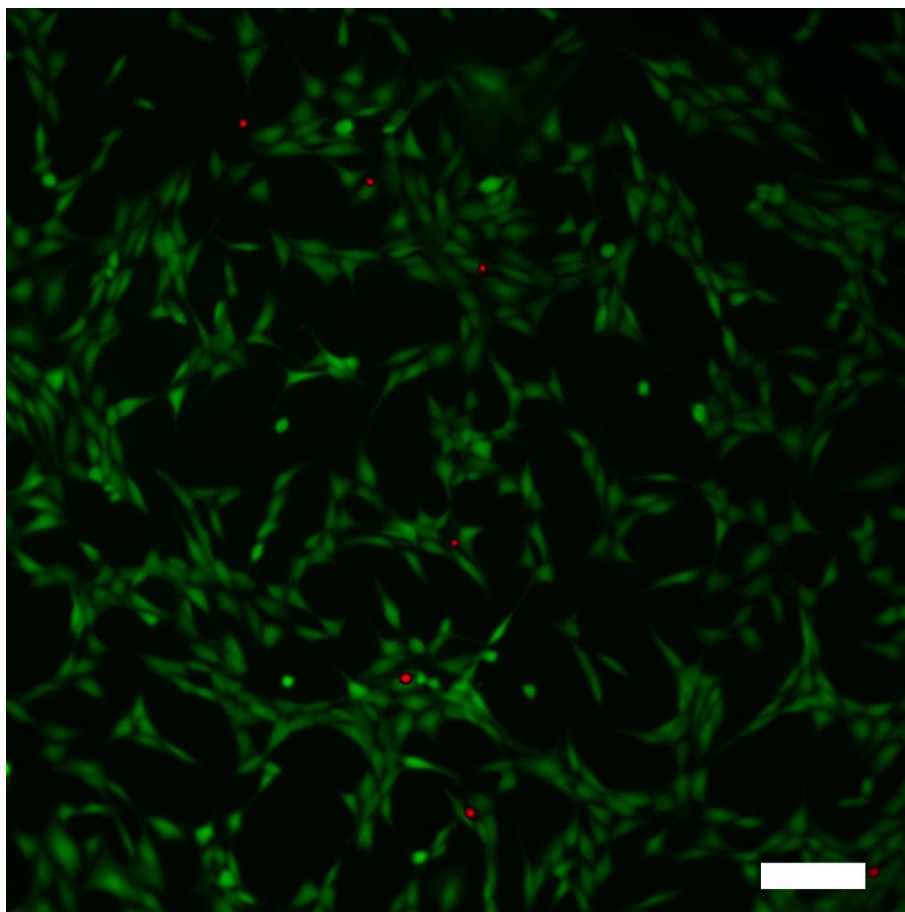
Relativní viabilita (*Graf 4*) byla stanovena na plastu kultivační desky a krycím skle. Tyto hodnoty jsou kontrolní. U testovaných materiálů PEDOT CNT a u uhlíkové pasty dosáhla relativní viabilita buněk srovnatelných hodnot jako u krycího skla. PEDOT CNT dosáhl ($73,7 \pm 6,4$) % viability. ATP nebyl proveden z důvodu interference materiálu s testem. Výsledná data testů cytotoxicity u uhlíkové pasty mohou být mírně zkreslená necelistvostí pasty nanesené na krycím skle. Tento materiál dosáhl ($77,1 \pm 1,8$) % v MTT testu a ($75,9 \pm 5,6$) % v ATP testu. Třetím testovaným materiálem v této sadě byla PEN folie. Z nízkých procent relativní viability ($13,8 \pm 6,0$) % v MTT testu a ($2,1 \pm 1,0$) % v ATP testu lze odvodit, že materiál byl pro buněčnou kulturu toxický.

7.5 Detekce viability pomocí fluorescenčního mikroskopu

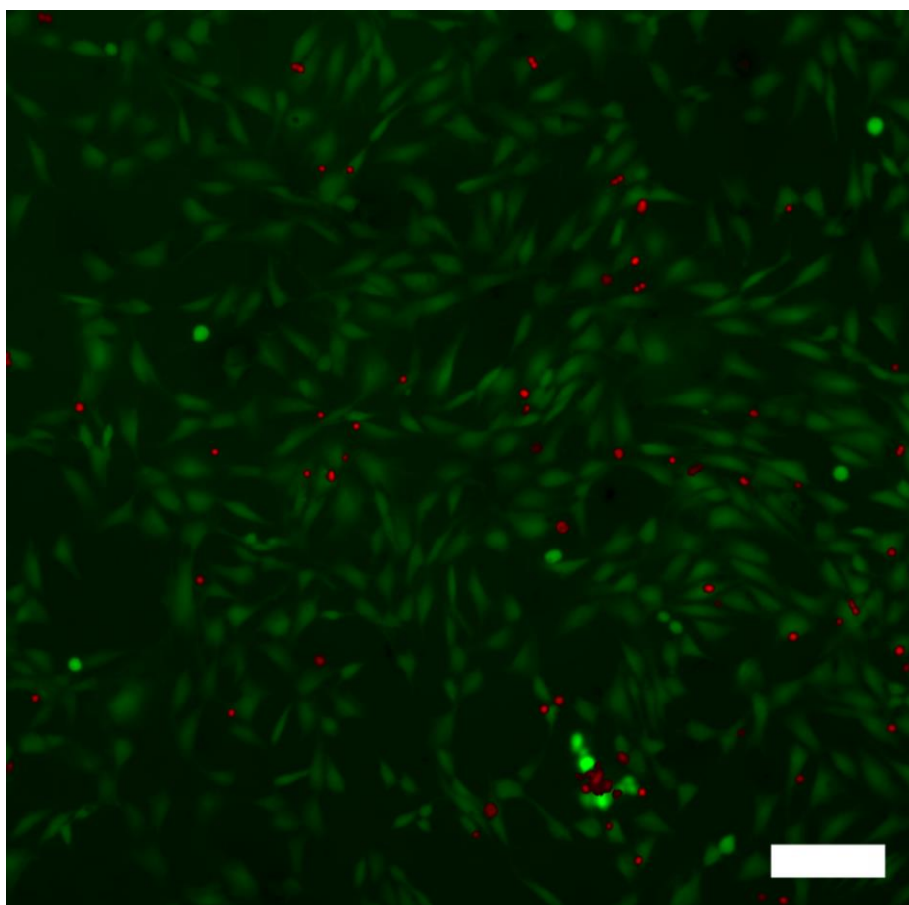
Viabilita buněčné kultury 3T3 fibroblastů rostoucích na materiálu PEDOT CNT a PEN folie byla paralelně detekována pomocí fluorescenčních látek PI a FDA. Kdy se PI naváže v buňce

na báze v dvoušroubovicové nukleové kyselině a červeně fluoreskuje. K tomuto procesu dochází pouze u mrtvých buněk [33]. Naopak zelenou fluorescenci způsobuje FDA. Proniká do živých a nepoškozených buněk, zde metabolizuje na polární fluorescein, který se uvnitř buňky hromadí [37, 64]. Poměr živých a mrtvých buněk byl porovnáván podle snímků z fluorescenčního mikroskopu.

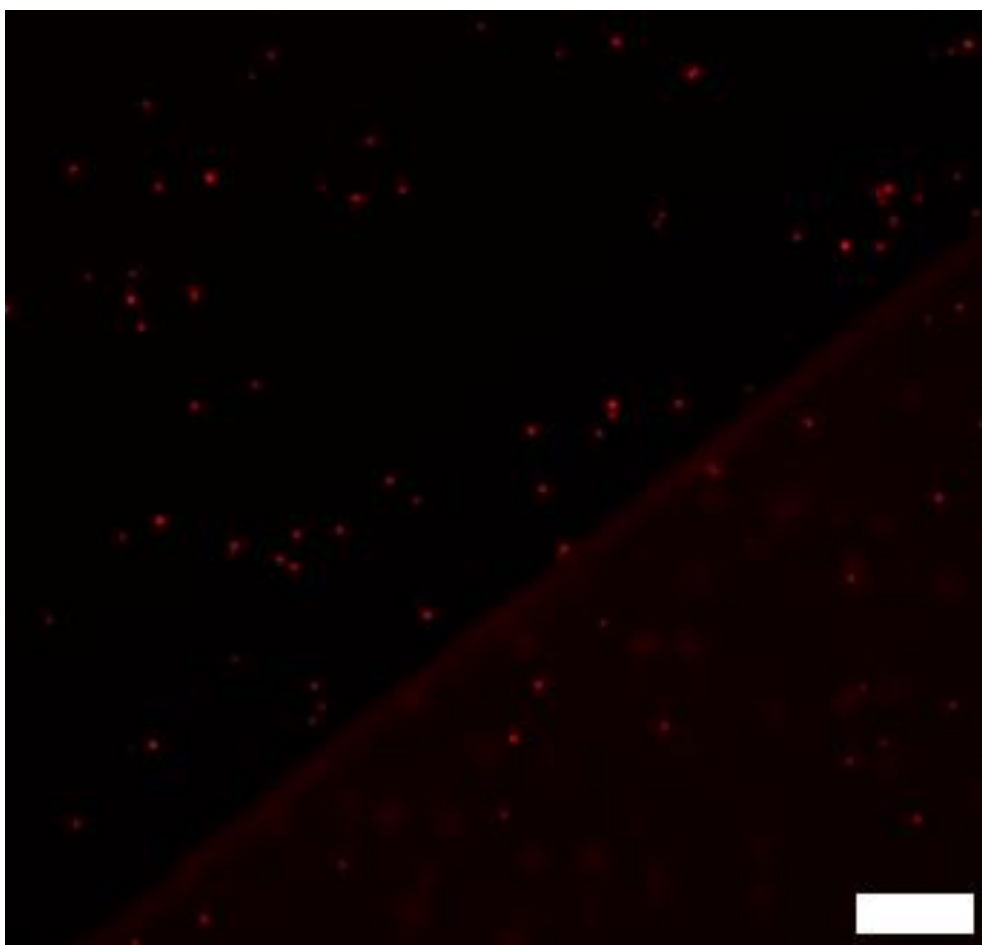
Výsledky z tohoto testu potvrdily výše prováděné testy (MTT a ATP test). Plast kultivačních misek byl používán jako kontrolní materiál. Na snímku (*Obr. 16*) je vidět intenzivní zelená fluorescence živých buněk a jen minimum mrtvých. Na následujícím snímku (*Obr. 17*) je materiál PEDOT CNT. Je zde větší procento mrtvých buněk, ale počet živých buněk je srovnatelný s plastem. Na poslední fotografii (*Obr. 18*) je vidět, že PEN folie nebyla biokompatibilní a buňky zde neproliferovaly a folie způsobila jejich úhyn.



Obr. 16: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu - plast kultivační misky. Měřítko snímku je 100 μm . Buněčná kultura (3T3 myší fibroblasty) byla inkubována 48 h při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly napipetovány roztoky PI a FDA. Fotografie byly pořízeny při různých vlnových délkách, zelená fluorescence FDA a červená fluorescence PI (*viz kapitola 6.6*). Fotografie z jednotlivých vlnových délek byly v programu ImageJ spojeny v jeden snímek.



Obr. 17: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu - PEDOT CNT. Měřítka snímku je 100 μm . Buněčná kultura (3T3 myší fibroblasty) byla inkubována 48 h při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly napipetovány roztoky PI a FDA. Fotografie byly pořízeny při různých vlnových délkách, zelená fluorescence FDA a červená fluorescence PI (viz kapitola 6.6). Fotografie z jednotlivých vlnových délek byly v programu ImageJ spojeny v jeden snímek.



Obr. 18: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu – PEN folie. Měřítka snímku je 100 μm . Buněčná kultura (3T3 myší fibroblasty) byla inkubována 48 h při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly napipetovány roztoky PI a FDA. Fotografie byly pořízeny při různých vlnových délkách, zelená fluorescence FDA a červená fluorescence PI (*viz kapitola 6.6*). Fotografie z jednotlivých vlnových délek byly v programu ImageJ spojeny v jeden snímek.

8 Shrnutí a diskuze

V rámci této bakalářské práce byly provedeny testy, kterými byla stanovena biokompatibilita materiálů, která je základní vlastností pro aplikace biomateriálů v různých medicínských oblastech. Obecně tento termín znamená absenci cytotoxicity, ale také pozitivní účinky na biologické funkce. Tyto materiály lze uplatnit v moderních technikách buněčné a molekulární biologie, např. remodelace tkání, vývoj hybridních orgánů, technologie enkapsulovaných buněk nebo v biosenzorických zařízeních. V dnešní době je časté testování biokompatibility *in vitro* [72].

Při stanovování biokompatibility *in vitro* byly použity 3T3 myší fibroblasty, protože nevyžadují složitou a náročnou kultivaci, mají dobrou reprodukovatelnost a dostatečnou citlivost pro cytotoxické testy [56].

Byly testovány dvě sady materiálů. V první sadě se jedná o nově syntetizované analogy flavinů, jejichž interakce s živými buňkami nebyly známy. Druhá sada zahrnovala PEDOT CNT, uhlíkovou pastu a PEN folii. Tyto materiály jsou komerčně dostupné a jsou využívány v elektronice pro konstrukci senzorů apod. Jejich možné využití pro bioelektronické aplikace vyžadovalo ověření biokompatibility těchto materiálů.

První sada materiálů obsahuje analogy flavinů. V organismu se flavin nachází ve formě riboflavinu, neboli vitamín B₂, který je znám jako antioxidant. Následně jako prostetická skupina v redoxních enzymech, flavin adenindinukleotid (FADH₂) a flavin mononukleotid (FMN) [65]. Flaviny patří mezi přírodní látky, jejichž základ je tvořen isoalloxazinem. Z chemického hlediska se jedná o univerzální prekurzory, protože je lze snadno syntetizovat a modifikovat např. pomocí aromatických substituentů. Modifikace vedou ke zlepšení optických, absorpčních a emisních vlastností. Mají velký potenciál pro technologii bioorganických polovodičů a následné využití elektronické platformy pro chirurgická zařízení, diagnostické implantáty, měkkou robotiku, biologicky rozložitelnou elektroniku nebo balení potravin [54].

Bylo testováno 8 derivátů flavinu (L21, L24, L31, L43, L48, L55, L66, L67), jejich názvy a struktury viz kapitola 4.1. Flavinové materiály byly hodnoceny pomocí úhlu smáčení, MTT testu, testu nepřímé toxicity a umožnění adheze buněk na povrch materiálu. Většina materiálů měla srovnatelný úhel smáčení s kontrolním krycím sklem, přibližně 70°, tedy hydrofilní charakter. Výjimku tvořily materiál L43, který vykazoval vysoce hydrofilní charakter, a materiál L55 hydrofobní charakter, který byl pravděpodobně způsoben přítomností dvou thiofenových skupin a jeho krystalickou strukturou, protože podobný materiál L24 s dvěma fenoly v molekule vykazoval výrazně nižší hydrofobicitu. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiophene#section=Computed-Properties>)

Výsledky úhlu smáčení korespondovaly s výsledky testu adheze buněk na povrch materiálů, kdy buněčná adheze hraje zásadní roli ve fyziologických procesech buňky. Uchycením buněk na povrchu přírodního nebo umělého materiálu se spouští biofyzikální reakce v buňce. Z tohoto

důvodu jsou tyto testy důležité v bioinženýrství při přípravě biosenzorů, umělých tkání apod. Adhezi lze podpořit např. potažením povrchu proteinů [62, 57, 66]. Fotografie ze světelného mikroskopu dokázaly, že buněčná kultura dobře adheruje na hydrofilním povrchu. Vysoce hydrofilní a hydrofobní charakter povrchu (materiály L43 a L55) nevytváří podmínky pro dobrou adhezi a dochází ve velké míře k úhynu buněk.

V testech cytotoxicity bylo zjištěno, že buňky kultivované na materiálech L21, L24, L31, L48, L66 a L67 dosáhly u MTT testu srovnatelné relativní viability jako krycí sklo v rozmezí 70–90 %. Tyto výsledky byly potvrzeny v testu měření úhlu smáčení. U testu nepřímé toxicity bylo dokázáno, že za sníženou biokompatibilitu materiálu L43 a L55 zodpovídá i uvolňování toxických látek do prostředí.

Druhá sada vzorků byly PEDOT CNT, uhlíková pasta a PEN folie.

PEDOT s uhlíkovými nanotrubičkami (CNT) vykazuje větší stabilitu než čistý PEDOT [67, 69]. Bylo zjištěno, že CNT zvyšuje životaschopnost a proliferaci buněk [68]. Dle článku [67] dosahuje PEDOT CNT v experimentech s buněčnými kulturami vysoké biokompatibility a adheze buněk. Výborné výsledky byly zaznamenány v měření signálů z buněk srdečního svalu a jeho stabilita byla potvrzena dlouhodobými testy. Velký potenciál má v kardiologickém a neurologickém výzkumu pro konstrukci stimulačních elektrod.

Biokompatibilita u materiálu PEDOT CNT byla ověřována pomocí MTT testu, fluorescence PI a FDA, pozorování adheze buněk na materiál a extrakce v PBS pufru. Na základě výsledků lze potvrdit, že materiál nevykazuje přímou toxicitu. Množství extrahovaných látek do PBS pufru nemělo žádný důsledek na viabilitu buněčné kultury při dalších testech. Proto lze brát tento materiál jako stabilní ve vodném prostředí. Relativní viabilita kultury 3T3 myších fibroblastů rostoucí na tomto materiálu byla stanovena na $(73,7 \pm 6,4) \%$. Z fotografií ze světelného mikroskopu lze potvrdit porovnatelné množství buněk s kontrolou. Schopnost adheze buněk na tento materiál byla snížena oproti krycímu sklu, jelikož buňky vykazovaly více zakulacený tvar.

Dalším testovaným materiálem byla uhlíková pasta, která je odolná vůči chemikáliím, rozpouštědlům a je vhodná pro práci ve velmi vlhkém prostředí (*viz kapitola 4.1*). Biosenzory na základě uhlíkové pasty jsou určeny pro stanovení fenolových sloučenin. Uhlíková pasta také umožňuje přidání katalyzátoru, elektronového mediátoru nebo biomolekuly do elektrody. Toto je široce využíváno na návrzích biosenzorů na bázi imobilizovaných enzymů. V průběhu výroby může být začleněna škála aditivních materiálů nebo molekul, aby byla zprostředkována enzymová reakce, stabilita biomolekul nebo se zlepšila selektivita biosenzoru [70].

Biokompatibilita uhlíkové pasty byla stanovována MTT testem, ATP testem a testem adheze buněk na povrch. Výsledky z těchto měření mohou být mírně zkresleny necelistvostí pasty nanesené na krycí sklo. Fotografie ze světelného mikroskopu je důkazem dobré adheze buněk. Buněčná kultura adheruje těsně u materiálu, z čehož se dá usoudit, že samotný materiál nebude

toxický. Relativní viabilita kultury 3T3 myších fibroblastů rostoucí na uhlíkové pastě byla stanovena na $(77,1 \pm 1,8) \%$ v MTT testu a $(75,9 \pm 5,6) \%$ v ATP testu.

Třetím materiálem byla PEN folie. Jedná se o chemicky odolný materiál, který by měl vykazovat dobrou biokompatibilitu a z tohoto důvodu je vhodným kandidátem pro výrobu biosenzorů. Navíc díky kondenzovaným aromatickým kruhům disponuje vysoké pevností, tepelné stabilitě, dobrému modulu pevnosti, chemickou a hydrolytickou odolností a tyto vlastnosti jsou využívány ve výrobě flexibilních displejích, kondenzátorech, organických diodách, solárních článcích a v jiných aplikacích flexibilní elektroniky [71].

U PEN folie byla biokompatibilita stanovována pomocí extrakce v PBS, adhezí buněk na povrch, MTT a ATP testem a pomocí fluorescenčního mikroskopu (PI a PDA barvení). Kultura 3T3 myších fibroblastů rostoucí na PEN folii dosáhla $(13,8 \pm 6,0) \%$ relativní viability v MTT testu a $(2,1 \pm 1,0) \%$ relativní viability v ATP testu. Výsledky cytotoxicity materiálu dokazují i fotografie ze světelného a fluorescenčního mikroskopu. Buňky mají kulatý tvar, což svědčí o jejich úhynu. Toxicitu materiálu způsobují látky, které uvolňuje folie do roztoku. To ukázal test extrakce v roztoku PBS pufru. Absorpční spektrum extrahované látky odpovídá naftalenu a jeho derivátům [73], který pravděpodobně vytvořil toxické prostředí, ve kterém byla buněčná kultura usmrcena. Vzorek testované folie nebyl biokompatibilní.

9 Závěr

V teoretické části byly shrnuty poznatky ohledně vodičů, polovodičů a izolantů se zaměřením na organické materiály a jejich využití pro biologické aplikace. V této souvislosti se teoretická část práce zabývala testováním biokompatibility a využitím buněčných kultur pro tento účel.

V praktické části byla stanovena biokompatibilita u dvou sad materiálů flavinové analogy a PEDOT CNT, uhlíková pasta a PEN folie. Pro stanovení byla použita buněčná linie 3T3 myši fibroblasty.

Byly provedeny následující testy: stanovení úhlu smáčení, testy stability materiálu (extrakce v roztoku PBS pufru), schopnost umožnit adhezi buněk na povrch a testy cytotoxicity (MTT test, test nepřímé toxicity, ATP test a fluorescenční test s PI a FDA).

Výsledky ukázaly, že flavinové materiály měly dobrou biokompatibilitu, která byla srovnatelná s kontrolním sklem, kromě vzorků L43 a L55. Podle výsledků z MTT testu byly tyto materiály (L43, L55) cytotoxické. Výsledky byly potvrzeny fotografiemi ze světelného mikroskopu. Při změření úhlu smáčení bylo zjištěno, že materiál L43 je vysoce hydrofilní a materiál L55 je hydrofobní. Tyto vlastnosti povrchů snížily adhezi buněk, což zapříčinilo nižší viabilitu buněk. U testu nepřímé toxicity bylo dokázáno, že za sníženou biokompatibilitu materiálu L43 a L55 zodpovídá i uvolňování toxických látek do prostředí.

U druhé sady bylo zjištěno, že PEDOT CNT a uhlíková pasta se mohou řadit mezi netoxické materiály. Na druhou stranu PEN folie uvolňuje velké množství látek, které jsou pro buňky toxické a způsobují jejich úhyn.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ:

- [1] MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* [online]. 2016, roč. 6, č. 2, s. 153-159 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002. ISSN 22124268. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212426815001323>
- [2] NEŠPŮREK, S. A M. MATYÁŠ. Elektroaktivní organické materiály. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie* [online]. 2016, r. 51, č. 1, s. 31-50 [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/141298/PokrokyMFA_51-2006-1_5.pdf
- [3] DŽUGAN, T., A M. KROUPA. Elektrická vodivost organických látek. *Elektroscope* [online]. 2013, č. III. Katedra technologií a měření/RICE, Fakulta elektrotechnická, ZČU v Plzni, Univerzitní 26, Plzeň, [cit. 2018-11-08]. ISSN 1802-4564. Dostupné z: http://ek702p10-ket.fel.zcu.cz/images/PDF/Rocnik2013/Cislo3_2013/r7c3c5.pdf
- [4] MARSHALL, B., 2001. How Semiconductors Work. *HowStuffWorks.com* [online]. [cit. 2018-11-05]. Dostupné z: <https://electronics.howstuffworks.com/diode.htm>
- [5] ANON. Elektrický proud v polovodičích. *Střední průmyslová škola Česká Lípa* [online]. [cit. 2018-11-05]. Dostupné z: https://spscl.cz/public/MatFyz/Soubory/Fyzika/14_pro-ud_v_polovodicich/polovodice.htm
- [6] PROKEŠ, J., S. NEŠPŮREK A J. STEJSKAL. Vodivé polymery: Inteligentní materiály pro nové století. *Vesmír* [online]. 2001, roč. 80, č. 131, s. 35-38 [cit. 2018-11-08]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-1/vodive-polymery.html>
- [7] QADIR, K. W. The Electronic Structure of Organic Semiconductors. *Electronic Processes in Organic Semiconductors* [online]. Weinheim, Germany, 2015, s. 1-86 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1002/9783527685172.ch1. ISBN 9783527685172. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527685172.ch1>
- [8] QADIR, K. W. Study of organic semiconductor based photovoltaic devices: light sensors and solar cells. 2016 [online]. [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.13140/RG.2.1.3206.9368.

Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/305904839_STUDY_OF_ORGANIC_SEMICONDUCTOR_BASED_PHOTOVOLTAIC_DEVICES_LIGHT_SENSORS_AND_SOLAR_CELLS

- [9] ŚWIST, A., A. J. SOŁODUCHO. Organic semiconductors – materials of the future? *CHEMIK* [online]. 2012, roč. 66, č. 4, s. 289-296 [cit. 2018-11-05]. ISSN 2450-7105.
- [10] TOUŠEK, J., A. J. TOUŠKOVÁ. Organická fotovoltaika: Jsou organické polovodiče budoucností energetiky?. *Vesmír* [online]. 2012, roč. 91, s. 508-509 [cit. 2018-11-15]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2012/cislo-9/organicka-fotovoltaika.html>
- [11] KALTENBRUNNER, M., M. S. WHITE, E. D. GŁOWACKI, T. SEKITANI, T. SOMEYA, N. S. SARICIFTCI A S. BAUER. Ultrathin and lightweight organic solar cells with high flexibility. *Nature Communications* [online]. 2012, roč. 3, č. 1, [cit. 2018-11-15]. DOI: 10.1038/ncomms1772. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms1772>
- [12] BRÜTTING, W. *Physics of organic semiconductors*. 2012, 2. completely new rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-41053-8.
- [13] KÖHLER, A., A. H. BÄSSLER. *Electronic Processes in Organic Semiconductors: An Introduction*. 2015 [online]. Weinheim: Wiley-VCH [cit. 2018-11-12]. ISBN 978-3-527-33292-2.
- [14] ROCHA, L., B. GEFFROY. Organic Light Emitting Diodes: materials, device structures and light extraction. *International Journal of Materials and Product Technology* [online]. 2009, roč. 34, č. 4, s. 454-468 [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.1504/IJMPT.2009.025000. ISSN 0268-1900.
- [15] BRACHMANN, S. Tang and Van Slyke Inducted into National Inventors Hall of Fame for Development of OLED Display Technology, 2018. *IPWatchdog.com* [online].

- [cit. 2018-11-24]. Dostupné z: <https://www.ipwatchdog.com/2018/09/03/tang-van-slyke-induced-national-inventors-hall-fame-development-oled-display-technology/id=100905/>
- [16] CHANG, J., Z. LIN, CH. ZHANG AND Y. HAO. Organic Field-Effect Transistor: Device Physics, Materials, and Process, 2017. *IntechOpen* [cit. 2018-11-24] DOI: 10.5772/intechopen.68215.
- [17] LAI S., F. A. VIOLA, P. COSSEDDU, A. BONFIGLIO. Organic Field-Effect Transistor-Based Sensors towards Biomedical Applications Fabricated with Large-Area Processes over Flexible Substrates. *Sensors* [online]. 2018, roč. 18 (2018), č. 3, [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.3390/s18030688. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/3/688>
- [18] ANON. Organic Field-Effect Transistor (OFET). *Printed electronics now* [online]. 2018 [cit. 2018-11-25]. Dostupné z: https://www.printedelectronicsnow.com/contents/view_glossary/2008-11-04/organic-field-effect-transistor-ofet
- [19] BABENSEE, J. E., J. M. ANDERSON, L. V. MCINTIRE, A. ANTONIOS, G. MIKOS. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998, roč. 33, č. 1-2, s. 111-139 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00023-4. ISSN 0169409X.
- [20] ANON. Medical Device Biocompatibility Testing – ISO 10993. *PacificBioLabs.com* [online]. [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <https://pacificbiolabs.com/biocompatibility>
- [21] IANNONE, J. Biocompatibility Explained: A Simple Understanding to a Complex Topic, 2013. *Toxicon* [cit. 2019-03-08].
- [22] GEWIRTH, A. A., A. H. SIEGENTHALER. *Nanoscale Probes of the Solid/Liquid Interface*. 2013, Springer Science & Business Media. ISBN 9401584354.
- [23] ANON. Introduction to Biocompatibility Testing. *PacificBioLabs.com* [online]. [cit. 2018-12-02]. Dostupné z: <https://pacificbiolabs.com/biocompatibility-testing>

- [24] XIAN, W. *A Laboratory Course in Biomaterials*, 2010 [online]. Boca Raton: CRC Press [cit. 2018-12-02]. ISBN 9781420076158.
- [25] RISS, T., R. MORAVEC, A. NILES, S. DUELLMAN, H. BENINK, T. WORZELLA, L. MINOR. *Cell Viability Assays*, 2013 [online]. [cit. 2018-10-30]. Dostupné z: <https://www.scribd.com/document/373749877/Bookshelf-NBK144065>
- [26] BRŮČKOVÁ, L. Stanovení cytotoxicity léčiv in vitro: XTT assay, 2015 [online]. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice [cit. 2018-10-30]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary/www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/cytotoxocita.pdf
- [27] ANON. Vybrant™ MTT Cell Viability Assay. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V13154?SID=srch-srp-V13154>
- [28] ANON. MTT test. *Laboratoř experimentální medicíny: Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test.htm>
- [29] LANGDON, S. P. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 2004. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. ISBN 1543-1894.
- [30] ANON. Cytotoxicity testing, 2008. *Biocentrum* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://www.biocentrum.com.pl/cytotoxicity-testing.html>
- [31] LEE, M.-S., W.-S. PARK, Y. KIM, W. AHN, S.-H. KWON, S. HER. Intracellular ATP Assay of Live Cells Using PTD-Conjugated Luciferase. *Sensors* [online]. 2012, roč. 12, č. 11, s. 15628-15637 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.3390/s121115628. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/12/11/15628>
- [32] ANON. ATP test, luminometr a bioluminiscence. Tři pojmy, které odhalí kvalitu úklidu. *De Wolf GROUP s.r.o.* [online]. 2018 [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <https://www.dewolf.cz/blog/atp-test-luminometr-bioluminiscence/>

- [33] ANON. Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide. *RnD systems: a Biotechnie brand* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
- [34] ANON. Fluorofory v biomedicině. *Univerzita Karlova Praha* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [35] ANON. Propidium Iodide. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP?ICID=sear>
- [36] MÜLLEROVÁ, L. *Analýza bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie*, 2016 [online]. Brno. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/58385>.
- [37] MOHR, L. R. a A. O. TROUNSON. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *Reproduction* [online]. 1980, roč. 58, č. 1, s. 189-196 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1530/jrf.0.0580189. ISSN 1470-1626. Dostupné z: <https://rep.bioscientifica.com//doi/10.1530/jrf.0.0580189>
- [38] BARNOY, E. A., R. POPOVTZER a D. FIXLER. Development of a molecular bioswitch using fluorescence lifetime imaging: Incremental activation of fluorescein diacetate. *Journal of Biophotonics* [online]. 2018, roč. 11, č. 2 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1002/jbio.201700084. ISSN 1864063X.
- [39] VERPLANCK, N., Y. COFFINIER, V. THOMY a R. BOUKHERROUB, 2007. Wettability Switching Techniques on Superhydrophobic Surfaces. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2007, roč. 2, č. 12, s. 577-596 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1007/s11671-007-9102-4. ISSN 1931-7573.
- [40] BARTÁKOVÁ, H., A. P. KLUSON. Stanovení povrchové smáčivosti tenkých vrstev a odbourání povrchově vázaných nečistot. *Chemie a chemické technologie* [online]. Počet stran: 3 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/labchcht-001/n150013-b6.pdf>

- [41] VISTEJNOVA, L., J. DVORAKOVA, M. HASOVA, T. MUTHNY, V. VELEBNY, K. SOUCEK, L. KUBALA. The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuroendocrinology Letters* [online]. 2009, roč. 30, č. 1, s.121-127 [cit. 2019-03-08]. ISSN 0172-780X.
- [42] ANON. Medical Device Biocompatibility Testing – ISO 10993. *PacificBioLabs.com* [online]. [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <https://pacificbiolabs.com/biocompatibilit>
- [43] LODISH, H. F. *Molecular cell biology*. 2000, 4th ed. New York: W.H. Freeman. ISBN 07-167-3136-3.
- [44] HRAZDIRA, I., V. MORNSTEIN A J. STANEK. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 2001, Brno: Neptun. ISBN 80-902-8961-4.
- [45] VEJRAŽKA, M. Buněčné kultury. *Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze* [online]. [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [46] OLEÁR, V., Z. KRIŠTÚFKOVÁ a M. ŠTEFKOVIČOVÁ. Tkanivové kultúry používané pre výrobu súčasných vakcín. *Avenier* [online]. [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://odbornost.avenier.cz/cz/tkanivove-kultury-pouzivane-pre-vyrobu-sucasnych-vakcin>
- [47] RUMML, T., M. RUMLOVÁ A V. PAČES. *Genové inženýrství*. 2002. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0499-8.
- [48] Anon. Co je to laminární box?, 2019. *Profiplants: Laboratory* [online]. [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <https://www.profiplants.cz/clanek/co-je-to-laminarni-box>
- [49] NAVRÁTIL, L., A J. ROSINA. *Medicínská biofyzika*. 2005, Praha: Grada. ISBN 80-247-1152-4.

- [50] MOTTL, J. *Teorie a praxe přípravy kultivačních a diagnostických půd v mikrobiologii*. 1979, Institut hygieny a epidemiologie v Praze ve spolupráci s VÚPL Bratislava [online]. Vydání 2., počet stran 131.
- [51] HUDECOVÁ, D. A V. MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. 2002, Bratislava: Vydavateľstvo STU. Edícia skript. ISBN 80-227-1663-4.
- [52] YAO, T., Y. ASAYAMA. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. 2017, roč. 16, č. 2, s. 99-117, [cit. 2019-02-10]. DOI: 10.1002/rmb2.12024. ISSN 14455781. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmb2.12024>
- [53] ČECH, S., D. HORKÝ a J. STANEK. *Přehled obecné histologie*. 2011, 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-5543-8.
- [54] RICHTAR, J., P. HEINRICHOVA, D. APAYDIN, et al. Novel Riboflavin-Inspired Conjugated Bio-Organic Semiconductors. *Molecules* [online]. 2018, roč. 23, č. 9, s.1856-1868, [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3390/molecules23092271. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2271>
- [55] GERWIG, R., K. FUCHSBERGER, B. SCHROEPPEL, et al. PEDOT–CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology, and Electrical Properties. *Frontiers in Neuroengineering* [online]. 2012, roč. 5. [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3389/fneng.2012.00008. ISSN 1662-6443. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneng.2012.00008/abstract>
- [56] ALTANKOV, G., F. GRINNELL, T. GROTH. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *Journal of biomedical materials research. B.m.: Wiley Online Library* [online]. 1996, roč. 30, č. 3, s. 385–391.
- [57] WEBB, K., HLADY V., TRESCO P.A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading,

- and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res* [online]. 1998, roč. 41, č. 3, s. 422–430. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659612>
- [58] ŠAFAŘÍKOVÁ, E., L. ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ, S. STRÍTESKÝ, L. KUBALA, M. VALA, M. WEITER a J. VÍTEČEK. Evaluation and improvement of organic semiconductors' biocompatibility towards fibroblasts and cardiomyocytes. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, roč. 260, s. 418-425 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.snb.2017.12.108. ISSN 09254005.
- [59] STRÍTESKÝ, S., M. VALA, J. DAVID, E. ŠAFAŘÍKOVÁ, J. VÍTEČEK a M. WEITER. Solution processable diketopyrrolopyrrole semiconductor: towards bio-electronic applications. *Chemical Papers* [online]. 2018, roč. 72, č. 7, s. 1635-1643 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1007/s11696-018-0479-6. ISSN 2585-7290.
- [60] STORY, S. P., S. H. PARKER, S. S. HAYASAKA, M. B. RILEY a E. L. KLINE. Convergent and divergent points in catabolic pathways involved in utilization of fluoranthene, naphthalene, anthracene... *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001, roč. 26, č. 6, s. 369-382 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1038/sj.jim.7000149. ISSN 1367-5435.
- [61] MAEDA H., T. MAEDA a K. MIZUNO. Absorption and Fluorescence Spectroscopic Properties of 1- and 1,4-Silyl-Substituted Naphthalene Derivatives. *Molecules* [online]. 2012, roč. 1, č. 5, s. 5108-5125 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3390/molecules17055108. ISSN 1420-3049.
- [62] KOBLINSKI, J. E. Matrix cell adhesion activation by non-adhesion proteins. *Journal of Cell Science* [online]. 2005, roč. 118, č. 13, s. 2965-2974 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1242/jcs.02411. ISSN 0021-9533.
- [63] CROUCH S.P.M., R. KOZLOWSKI, K.J. SLATER a J. FLETCHER. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1993, roč. 160, č. 1, s. 81-88 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90011-U. ISSN 00221759.

- [64] ROSS D. D., C. C. JONECKIS, J. V. ORDÓÑEZ, A. M. SISK, R. K. WU, A. W. HAMBURGER a R. E. NORA. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *The Journal of Cancer Research* [online]. 1989, roč. 49, č. 14, s. 3776-3782 [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2736519>
- [65] CHAUDHURI S., S. SARDAR, D. BAGCHI, S. S. SINGHA, P. LEMMENS a S. K. PAL. Sensitization of an Endogenous Photosensitizer: Electronic Spectroscopy of Riboflavin in the Proximity of Semiconductor, Insulator, and Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry A* [online]. 2015, roč. 119, č. 18, s. 4162-4169 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1021/acs.jpca.5b03021. ISSN 1089-5639. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpca.5b03021>
- [66] FANG N., A. ZHU, M. B. CHAN-PARK a V. CHAN. Adhesion Contact Dynamics of Fibroblasts on Biomacromolecular Surfaces. *Macromolecular Bioscience*. [online]. 2005, roč. 5, č. 10, s. 1022-1031 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1002/mabi.200500123. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200500123>
- [67] GERWIG R., K. FUCHSBERGER, B. SCHROEPPPEL, et al. PEDOT–CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology, and Electrical Properties. *Frontiers in Neuroengineering* [online]. 2012, roč. 5, [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.3389/fneng.2012.00008. ISSN 1662-6443. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneng.2012.00008/abstract>
- [68] MAZZATENTA A., M. GIUGLIANO, S. CAMPIDELLI, L. GAMBAZZI, L. BUSINARO, H. MARKRAM, M. PRATO a L. BALLERINI. Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *Journal of Neuroscience* [online]. 2007, roč. 27, č. 26, s. 6931-6936 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007. ISSN 0270-6474. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>
- [69] LUO X., C. L. WEAVER, D. D. ZHOU, R. GREENBERG a X. T. CUI. Highly stable carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for chronic neural

- stimulation. *Biomaterials* [online]. 2011, roč. 32, č. 24, s. 5551-5557 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.051. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296121100473X>
- [70] MAILLEY P., E. A. CUMMINGS, S. C. MAILLEY, B. R. EGGINS, E. MCADAMS, S. COSNIER, 2003. Composite Carbon Paste Biosensor for Phenolic Derivatives Based on in Situ Electrogenenerated Polypyrrole Binder. *Analytical Chemistry* [online]. roč. 75, č. 20, s. 5422-5428 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1021/ac034177y. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac034177y>
- [71] KARNATI, C., R. AGUILAR, C. ARROWOOD, J. ROSS a S. RAJARAMAN. Micromachining on and of Transparent Polymers for Patterning Electrodes and Growing Electrically Active Cells for Biosensor Applications. *Micromachines* [online]. 2017, roč. 8, č. 8 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.3390/mi8080250. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-666X/8/8/250>
- [72] KIRKPATRICK C. J, F. BITTINGER, M. WAGNER, H. KÖHLER, T. G. VAN KOOTEN, C. L. KLEIN a M. OTTO. Current trends in biocompatibility testing. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H. *Journal of Engineering in Medicine*. 2016, roč. 212, č. 2, s. 75-84 [cit. 2019-05-03]. ISSN 0954-4119. DOI: 10.1243/0954411981533845.
- [73] LUO, H., L. SU, J. ZHANG, W. YUAN, S. LIU, Y. WANG, C. WANG a X. WANG, 2017. C-shape microfiber taper interferometer for simultaneous measurement of curvature and temperature. *Optik* [online]. Roč. 145, s. 181-187 [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.1016/j.ijleo.2017.07.014. ISSN 00304026. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0030402617308318>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
DMEM	Dulbeccova modifikace Eagleova média (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
FBS	Fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum)
FDA	Fluorescein diacetát
HOMO	Nejvyšší obsazený molekulový orbital (Highest Occupied Molecular Orbital)
LCD	Displej s tekutými krystaly (Liquid Crystal Display)
LUMO	Nejnižší neobsazený molekulový orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OCMFET	Tranzistor se zvláštní strukturou (Organic Charge Modulated Field Effect Transistors)
OFET	Organický tranzistor řízený elektrickým polem (Organic Field-Effect Transistor)
OLED	Organická elektroluminiscenční dioda (Organic Light-Emitting Diode)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
PEDOT-CNT	Poly(3,4-ethylendioxythiophen) s uhlíkovými nanotrubičkami (Carbon nanotubes)
PEN	Polyethylennaftalát
PI	Propidium jodid
WST-1	4-[3-(4-Iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-5-tetrazolio]-1,3-benzen
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid